

**Verhältnis der Lymphgefäßdichte zur synchronen nodalen  
Metastasierung und zur Blutgefäßdichte in  
pharyngealen Plattenepithelkarzinomen.**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae ( Dr.med. )**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Sarah Stötzel  
geboren am 26.11.1983 in Erfurt**

**Meiner Familie**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>3</b>
2.1. Angiogenese – zentraler Forschungsgegenstand in der Onkologie	3
2.1.1. Mechanismen und Regulatoren der Angiogenese	4
2.1.1.1. Die Familie der VEGFs.....	5
2.1.1.2. VEGF und seine Rezeptoren VEGFR-1 und -2.....	6
2.1.2. Angiogenese in soliden Tumoren.....	7
2.1.3. MVD – ein hoffnungsvoller histopathologischer Prognosefaktor.....	7
2.1.4. Anti-Angiogenese als zukunftsweisende Therapie solider Tumore....	8
2.2. Lymphgefäße in der aktuellen Gefäßforschung.....	9
2.2.1. Die Wachstumsfaktoren der Lymphangiogenese.....	10
2.2.2. Die Entwicklung spezifischer Lymphgefäßmarker.....	11
2.2.2.1. Lyve-1.....	12
2.2.2.2. D2-40.....	13
2.3. Mechanismen der Metastasierung solider Tumoren.....	14
2.4. Zielstellung.....	15
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
3.1. Gewebematerial.....	16
3.2. Klassifikation pharyngealer Plattenepithelkarzinome.....	17
3.2.1. Lokalisation.....	17
3.2.2. Typing.....	17
3.2.3. Grading.....	18
3.2.4. TNM-Klassifikation.....	18
3.3. Paraffineinbettung und konventionelle Histologie.....	20
3.4. Immunhistochemie.....	21
3.4.1. Vorbehandlung des Gewebes.....	21
3.4.2. Primäre Antikörper.....	21

3.4.3. Die LSAB-Methode.....	22
3.4.4. Bewertung der Immunreaktion.....	23
3.5. Statistische Auswertung.....	24
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>25</b>
4.1. Qualitative und quantitative Auswertung der Lymphgefäßdichte.....	25
4.1.1. Expressionsmuster der Lymphendothelzellmarker.....	26
4.1.2. Vergleich der Lymphgefäßdichte von nicht neoplastisch verändertem Stroma mit pharyngealen Plattenepithelkarzinome.....	28
4.1.3. Vergleich der Lymphgefäßdichte zur nodalen Metastasierung.....	28
4.1.4. Vergleich der Lymphgefäßdichte zur T-Kategorie.....	29
4.1.5. Vergleich der Lymphgefäßdichte zum Grading.....	30
4.1.6. Vergleich der Lymphgefäßdichte von Karzinomen unterschiedlicher Lokalisation.....	31
4.1.7. Vergleich der Lymphgefäßdichte zur Lymphgefäßinvasion.....	31
4.2. Qualitative und quantitative Auswertung der Blutgefäßdichte mittels FVIII...32	
4.2.1. Vergleich der Blutgefäßdichte von nicht neoplastisch verändertem Stroma mit pharyngealen Plattenepithelkarzinomen.....	33
4.2.2. Vergleich der Blutgefäßdichte zur T-Kategorie.....	33
4.2.3. Vergleich der Blutgefäßdichte zur nodalen Metastasierung.....	34
4.2.4. Vergleich der Blutgefäßdichte zum Grading.....	35
4.2.5. Vergleich der Blutgefäßdichte von Karzinomen unterschiedlicher Lokalisation.....	35
4.3. Analyse der Zusammenhänge zwischen Lymph- und Blutgefäßdichte.....	36
4.4. Analyse der prognostischen Bedeutung von Lymph- und Blutgefäßdichte für die synchrone nodale Metastasierung.....	36
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>38</b>
5.1. Gefäßforschung in der Onkologie.....	38
5.2. Neue Lymphendothelzellmarker - reproduzierbare Darstellung der Lymphgefäße trotz Kreuzreaktivität.....	39

5.3. Bedeutung der Blutgefäßdichte und Verhältnis zur Lymphgefäßdichte.....	41
5.4 Tumorinduzierte Lymphangiogenese oder vorbestehende Lymphgefäße.....	43
5.5. Die Invasionszone als Ort der Lymphangiogenese.....	44
5.6. Die Lymphgefäßdichte als Indikator der nodalen Metastasierung.....	46
5.7. Die Lymphgefäßdichte im pharyngealen Plattenepithelkarzinom.....	46
5.8. Anti-Lymphangiogenese als Perspektive in der Therapie solider Tumore.....	48
 <b>6. Schlussfolgerung .....</b>	<b>50</b>
 <b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>51</b>
 <b>8. Anhang</b>	

## **1. Zusammenfassung**

Die Angiogenenese ist die Voraussetzung für das progressive Wachstum solider Tumore mit einem Durchmesser größer 2mm. Die Erfassung der Blutgefäßdichte und die Modulation der Angiogenese war und ist Ziel zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen und hat bereits zu praxistauglichen Therapiestrategien geführt. Im Kontrast dazu wird die Lymphgefäßdichte als Indikator einer nodalen Metastasierung, aus Mangel an spezifischen Markern für das Lymphendothel, erst seit kurzer Zeit beleuchtet. Zwar konnte die Lymphangiogeneseforschung bereits Fortschritte verzeichnen, die prognostische Bedeutung der Lymphgefäße im Fall von Kopf-Hals-Tumoren ist jedoch nicht eindeutig geklärt.

Die wenigen Arbeiten zur Lymphgefäßdichte weisen widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Lymphangiogenese und ihrer Bedeutung für die nodale Metastasierung auf.

Gegenstand dieser Arbeit ist die standardisierte Erfassung der lymphatischen Mikrogefäßdichte mit zwei aktuellen Antikörpern in pharyngealen Plattenepithelkarzinomen. Das Verhältnis der quantitativ bewerteten Lymphgefäßdichte zur synchronen nodalen Metastasierung und zur Blutgefäßdichte sowie zur pT-Kategorie, dem Grading, der Lymphgefäßinvasion und der Lokalisation der Karzinome wird unter Verwendung des exakten Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests analysiert. Zusätzlich erfolgt der Vergleich mit nicht neoplastisch verändertem Stroma sowie die Durchführung einer logistischen Regressionsanalyse zur Bewertung der prognostischen Aussagekraft der Lymphgefäßdichte.

Die Auswertung erfolgte an einem homogenen nach einheitlichen Untersuchungsstandards einer Klinik bewerteten Patientengut. Das untersuchte Gewebe umfasst 57 Plattenepithelkarzinome mit den Lokalisationen Oro- und Hypopharynx sowie 7 Präparate nicht neoplastisch veränderten Stromas der Kopf-Hals-Region. Mittels zertifiziertem Autostainer (K5005, Dako, Dänemark) wurde die standardisierte Immunhistochemie in Form der LSAB-Methode durchgeführt. Die Bewertung der Blut- und Lymphgefäßdichte erfolgte analog den Vorgaben Noel Weidners.

Mit Hilfe der immunhistochemischen Marker Lyve-1 und D2-40 gelang die Darstellung der Lymphgefäße und die Differenzierung zu den Blutgefäßen im histologischen Präparat. Die quantitative Analyse der Lymphgefäßdichte ließ erkennen, dass die lymphogenen hotspots vorzugsweise in der Invasionszone lokalisiert waren. Die peritumorale Lymphgefäßdichte zeigte sich im Vergleich von nicht metastasierten zu nodal metastasierten Karzinomen als signifikant erhöht. Die mittels Lyve-1 bewertete peritumorale Lymphgefäßdichte stellte

sich in der logistischen Regressionsanalyse, neben dem Grading, als bedeutsamster Einflussfaktor hinsichtlich der synchronen nodalen Metastasierung heraus.

Die Ergebnisse belegen, dass die Lymphgefäßdichte der Invasionszone ein Indikator der nodalen Metastasierung im pharyngealen Plattenepithelkarzinom ist. Im Vergleich der einzelnen pT-Kategorien zeigten Karzinome der pT1 und pT2 Kategorien eine gegenüber pT3 und pT4 Karzinomen signifikant erhöhte Lymphgefäßdichte, so dass geschlussfolgert werden kann, dass die Lymphangiogenese ein frühzeitig stattfindender Prozess in der Progression pharyngealer Plattenepithelkarzinome ist. Im Zusammenhang mit dem Grading zeigte sich ein Anstieg der Lymphgefäßdichte mit zunehmender Entdifferenzierung. Ob die Sekretion lymphangiogener Wachstumsfaktoren mit steigendem histopathologischem Grading zunimmt ist bisher nicht geklärt.

Blut- und Lymphgefäßdichte zeigten keine Korrelation zueinander, so dass nach der eigenen Studie angenommen werden muss, dass Angiogenese und Lymphangiogenese trotz verwandter Wachstumsfaktoren unabhängig regulierte Prozesse sind. Die Ergebnisse der Arbeit belegen, dass von der Blutgefäßdichte eines Tumors nicht auf die Lymphgefäßdichte rückgeschlossen werden kann, da Blut- und Lymphgefäßdichte zwei prognostische Parameter mit unterschiedlichem konzeptionellem Hintergrund sind. Zentral im Tumor gelegene Lymphgefäße konnten in der überwiegenden Zahl der Karzinome nachgewiesen werden, stellten sich aber vorwiegend als schmaler Endothelsaum dar.

Beweise für die Funktionalität dieser Gefäße und der daraus resultierende Beitrag zur nodalen Metastasierung stehen bis heute aus. Da die Lymphangiogenese ihren Ursprung von vorbestehenden Lymphgefäßen nimmt und die peritumorale Lymphgefäßdichte die Zone der lymphogenen hotspots ist, kann angenommen werden, dass die Invasionszone Ort der Lymphangiogenese ist und eine wesentliche Funktion für die Bildung nodaler Metastasen innehat. Die frühe und primär lymphogene Metastasierung pharyngealer Plattenepithelkarzinome könnte ihren Ursprung in der erhöhten peritumoralen Lymphgefäßdichte haben, da die Chance der Tumorzellverbreitung über die Erweiterung des lymphatischen Fensters enorm gesteigert wird. Nach dem aktuellen Wissensstand kann davon ausgegangen werden, dass die erhöhte peritumorale Lymphgefäßdichte einer tumorinduzierten Lymphangiogenese entstammt. Die peritumorale Lymphgefäßdichte stellt als Indikator der synchronen nodalen Metastasierung eine Erweiterung des Stagings hinsichtlich des Lymphknotenstatus für das pharyngeale Plattenepithelkarzinom dar.

## **2. Einleitung**

### **2.1. Angiogenese – zentraler Forschungsgegenstand in der Onkologie**

Angiogenese ist die Neubildung von Blutgefäßen durch das Aussprossen von Endothelzellen aus vorbestehenden Gefäßen. Bereits 1939 beschreibt Ide das Wachstum tumorassoziierten Blutgefäße am Brown Pearce Tumor (Ide et al. 1939). Auch Algire beobachtet die Größenzunahme von Tumoren im Zusammenhang mit einer verstärkten Blutgefäßbildung (Algire et al. 1945). Die These über die Abhängigkeit des Wachstums solider Tumore von der Gefäßneubildung wird erstmals 1970 von Judah Folkman formuliert und kann als Beginn der modernen Angiogeneseforschung angesehen werden (Folkman 1971).

In vitro Experimente, welche das exponentielle Wachstum solider Tumore in Abhängigkeit der Gefäßneubildung zeigen, lieferten erste Beweise (Folkman 1990). Im Weiteren konnte das angiogeneseabhängige Wachstum in Tumortransplantationsexperimenten nachgewiesen werden (Gimbrone et al. 1974). In der avaskulären Phase besteht in soliden Tumoren auf Grund der mangelhaften nutritiven Versorgung ein Gleichgewicht aus Proliferation und Apoptose. Die Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen sowie der Abtransport von Stoffwechselprodukten gelingen nur über eine definierte Strecke von 150-200µm (Fidler und Ellis 1994). Diese Kapazität ist ab einer Tumorgöße von 2 - 3mm im Durchmesser erschöpft. Das Ruhestadium besteht auf unbegrenzte Zeit bis über die Bildung neuer Blutgefäße ein Anschluss an die systemische Zirkulation erfolgt und eine adäquate Versorgung der Tumorzellen gewährleistet werden kann (Folkman und Hochberg 1973).

Die Induktion der Kapillaraussprossung, der angiogenic switch, markiert den Beginn der vaskulären Phase und des exponentiellen Tumorwachstums. Analog zu den Vorgängen im Primärtumor ist auch das Wachstum von Metastasen angiogeneseabhängig (Folkman 1990). Die Größenzunahme des Primärtumors und dessen Metastasen sind bedeutsame prognostische Parameter maligner Tumore.

Im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapiestrategien, welche aus einem tieferen Verständnis dieser Prozesse resultieren könnten, hat sich das angiogeneseabhängige Wachstum solider Tumore zu einem zentralen Forschungsthema in der Onkologie entwickelt.



### **2.1.1. Mechanismen und Regulatoren der Angiogenese**

Angiogenese findet im adulten Organismus unter physiologischen und pathologischen Bedingungen im Rahmen des weiblichen Reproduktionszyklus und einer Vielzahl von Erkrankungen, unter anderem während der Wundheilung statt. Die Zusammenhänge zwischen der Angiogenese und dem Wachstum sowie der Metastasierung solider Tumore werden im Folgenden dargestellt.

Die Ausprägung des angiogenen Phänotypus, der angiogenic switch, kennzeichnet das Stadium in welchem Tumorzellen in der Lage sind angiogene Wachstumsfaktoren zu sezernieren (Kumar et al. 1998). Für diese Entwicklung sind verschiedene Mechanismen verantwortlich, die zu einer Störung des physiologischen Gleichgewichtes von proangiogenen und antiangiogenen Faktoren führen. Zufällige genetische Veränderungen, wie die Aktivierung von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, stellen die Grundlage dar (Bouck 1990). Als weiterer Einflussfaktor gilt die Zytokinfreisetzung durch Zellen der inflammatorischen Begleitreaktion.

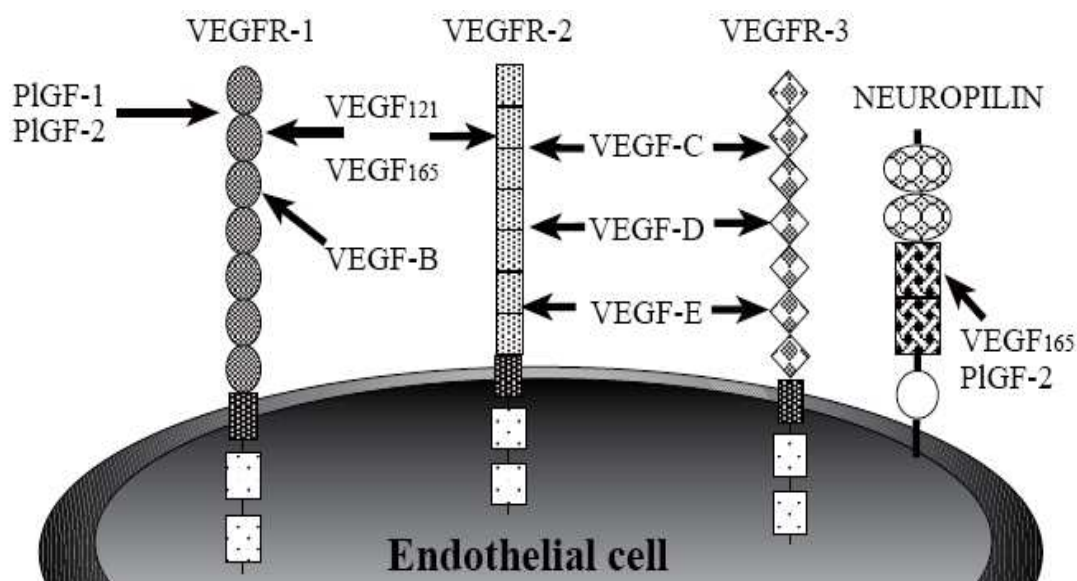
Der in der Tumormasse entstehende Zellstress bestehend aus Hypoxie, Azidose, Hypoglykämie und mechanischem Druck führt ebenso zur Freisetzung proangiogener Faktoren (Eriksson und Alitalo 1999). Wird die Angiogenese induziert, erfolgt der Abbau der extrazellulären Matrix und der Basalmembran vorbestehender Blutgefäße durch proteolytische Enzyme wie zum Beispiel Matrixmetalloproteasen.

Das Aussprossen und die Migration der Endothelzellen in den Perivasalraum entlang der extrazellulären Matrix kann so realisiert werden. Abschließend erfolgt die Reorganisation zu Kapillaren und die Bildung neuer Basalmembranen sowie der Anschluss an die systemische Zirkulation. Während die Entwicklung des embryonalen Gefäßsystems, die Vaskulogenese, als ein genau regulierter physiologischer Prozess in einem regelrecht geformten Gefäßnetz mündet, beschreibt die Angiogenese die Neubildung von Blutgefäßen, welche keinen festen Regeln folgt. Insbesondere das tumorassoziierte Gefäßnetz ist gekennzeichnet durch eine Reihe von Abweichungen, darunter abnorme arteriovenöse und arteriolymphatische Kurzschlüsse, dem Fehlen von Perizyten, lückenhaft ausgebildete Basalmembranen und fehlende Interzellularkontakte, welche eine erhöhte Gefäßpermeabilität zur Folge haben (Baluk et al. 2003). Als Ursache wird die 50-200fach erhöhte Proliferationsgeschwindigkeit und damit verbundene unzureichende Ausreifung der Endothelzellen angesehen (Denekamp et al. 1984)

Eine Fülle proangiogener und antiangiogener Moleküle konnte bereits identifiziert werden, darunter TNF $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ), Angiopoetin, Prostaglandin E1 und E2, FGF (Fibroblast growth factor) als Stimulatoren und Angiostatin, Interferon  $\alpha$  und  $\beta$ , Heparinase, Thrombospondin und Endostatin als Inhibitoren (Ferrara und Alitalo 1999). Die Familie der VEGFs und deren Rezeptoren stellen die bedeutsamsten und am besten untersuchten Wachstumsfaktoren der Angiogenese dar und sollen im Weiteren besprochen werden.

### 2.1.1.1. Die Familie der VEGFs

Die Familie der VEGFs (vascular endothelial growth factors) setzt sich, wie in Abbildung 1 dargestellt, aus den bisher identifizierten Mitgliedern: VEGF oder VEGF-A, PlGF (Placenta growth factor), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E zusammen (McColl et al. 2004). Sie gelten als wichtigste Regulatoren von Vaskulogenese, Angiogenese und Lymphangiogenese. Die strukturelle Ähnlichkeit der Glykoproteine hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz, insbesondere der VHD (very homolog domain), welche die Rezeptorbindungsstelle beinhaltet, vereint die Mitglieder der VEGFs. Nach dem alternativen splicing können die Wachstumsfaktoren zusätzlich in verschiedene Isoformen unterteilt werden. Unterschiede zwischen den Mitgliedern und deren Isoformen zeigen sich hinsichtlich ihrer Verteilung in den Geweben, den Rezeptorbindungseigenschaften und den erzielten Wirkungen.



**Abb. 1** Die Familie der VEGFs und deren Rezeptoren ( Ferrara und Alitalo 1999).

Die Signaltransduktion erfolgt über die Tyrosinkinaserzeptoren VEGFR-1, -2 und -3 (Eriksson und Alitalo 1999). Zusätzlich existieren akzessorische Rezeptoren, welche durch die Bindung der VEGFs aktiviert werden können, darunter Neuropilinrezeptoren.

#### **2.1.1.2. VEGF und seine Rezeptoren VEGFR-1 und -2**

Ehrmann und Knoth wiesen in Experimenten mittels Milliporfiltern einen humoralen Faktor nach, welcher über Diffusion mitogen auf Endothelzellen wirkt (Ehrmann und Knoth 1968). Dieser Tumorangiogenesefaktor (TAF) konnte aus humanen Tumorzellen isoliert werden (Folkman et al. 1971). Erstmals als vascular permeability factor (VPF) von Senger und Mitarbeitern beschrieben wurde dieser Wachstumsfaktor später, auf Grund seiner selektiven proliferativen Wirkung auf Endothelzellen, als VEGF bezeichnet (Senger et al. 1983; Ferrara und Henzel 1989). Derzeit werden fünf Isoformen unterschieden.

Die auf den Gefäßendothelzellen lokalisierten Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 ermöglichen die Signaltransduktion. VEGFR-2 wird vorwiegend auf den Endothelzellen der Blutgefäße exprimiert (Eriksson und Alitalo 1999). Experimente an knock out Mäusen weisen VEGFR-2 als essentiell für Vaskulogenese und Angiogenese aus (Shalaby et al. 1995). VEGFR-1 wird zusätzlich auf monozytären Zellen und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert und ist auch in gelöster Form vorhanden. Es wird angenommen, dass der VEGFR-1 über die Bindung von VEGF-A eine regulierende Funktion auf dessen Wirkung während der Embryogenese hat (Shibuya 2006). VEGF-A wirkt nicht nur mitogen, sondern auch anti-apoptotisch und chemotaktisch auf Endothelzellen. Weiterhin werden eine erhöhte Gefäßpermeabilität, die Aktivierung von Proteasen und Kollagenasen, die Stimulierung der Hämatopoese und der Monozytenmigration unter dem Einfluss von VEGF-A beobachtet (Carmeliet 2005). Während der Embryonalentwicklung führt die Deletion eines Allels von VEGF-A zur Letalität (Carmeliet et al. 1996). Die Expression von VEGF-A kann durch eine Vielzahl von Faktoren induziert werden. Hypoxie, als Konsequenz einer inadäquaten Perfusion und eines erhöhten Sauerstoffbedarfs, stellt über die Bildung des Transkriptionsfaktors HIF (hypoxia inducible factor), einen der potentesten Induktionsmechanismen dar (Shweiki et al. 1992). Ebenso kann durch Azidose die Expression gesteigert werden (Fukumura et al. 2001). Die Sekretion von VEGF-A erfolgt durch Fibroblasten, Makrophagen, Keratinozyten und auch Tumorzellen (Fukumura et al. 2001).

### **2.1.2. Angiogenese in soliden Tumoren**

Solide Tumore zeigen, ebenso wie deren Metastasen, ein angiogeneseabhängiges Wachstum (Folkman 1990). Der Zusammenhang zwischen der Blutgefäßdichte und der Prognose maligner Erkrankungen konnte zuerst für das maligne Melanom, das Prostatakarzinom sowie für das Mammakarzinom gesichert werden (Srivastava et al. 1988; Weidner 1995b). Noel Weidner stellt außerdem die Mikrogefäßdichte als unabhängigen Faktor für das Überleben der Patienten heraus (Weidner 1995a).

Heute existiert eine kaum überschaubare Anzahl von Untersuchungen zur Blutgefäßdichte an fast allen Tumorentitäten. Für die Mehrzahl konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer erhöhten Mikrogefäßdichte und einer signifikant schlechteren Prognose, gemessen an der verminderten Überlebenszeit, festgestellt werden (Weidner 1995a). Entsprechend den Ergebnissen der Blutgefäßdichte, konnte eine erhöhte Expression der Wachstumsfaktoren der Angiogenese in Assoziation mit dem Wachstum und der Metastasierung solider Tumoren nachgewiesen werden (Carmeliet 2005).

### **2.1.3. MVD – ein hoffnungsvoller histopathologischer Prognosefaktor**

Das, für die Objektivierung der Angiogenese, am weitesten verbreitete Verfahren ist die mittels spezieller Immunhistochemie realisierte quantitative Messung der tumorassoziierten Mikrogefäßdichte. Ziel ist die Bestimmung des individuellen Gefäßstatus eines malignen Tumors (Folkman 1971). Zu den typischen Panendothelzellmarkern zählen CD 31, CD 34 und FVIII/vWF (von Willebrand Faktor). Die Intensität der intratumoralen Blutgefäßdichte zu bewerten, ging von Brem und Mitarbeitern aus (Brem et al. 1972). Ihr MAG-System (microscopic angiogenesis grading system) beinhaltet die Auswertung der Gefäßproliferation sowie der Endothelzellhyperplasie und -zytologie.

Noel Weidner prägte den Begriff der microvessel density (MVD) als histologisches Korrelat der tumorassoziierten Angiogenese (Weidner 1995b). Bewertet wird die Blutgefäßdichte in den gefäßreichsten Tumorealen, den vaskulären hotspots, da diese das angiogene Potential des Tumors am besten widerspiegeln. Es werden Arteriolen, Kapillaren und Venulen ausgezählt, wobei die Miterfassung von Lymphgefäßen unter Verwendung von FVIII nicht ausgeschlossen werden kann. Die Gefäßdichte wird pro Fläche als arithmetisches Mittel verschiedener Gesichtsfelder oder als absolute Anzahl des

gefäßreichsten Gesichtsfeldes angegeben. Ein Maß für die nutritive Versorgung der Tumorzellen ist die PVC (perivaskular cuff).

Diese perivaskuläre Manschette bezeichnet konzentrisch um ein Gefäß angeordnete Tumorzellen. Je größer die Entfernung der Tumorzellen von dem Blutgefäß, desto größer ist die Diffusionsstrecke und desto schlechter ist die Versorgung der Tumorzellen (Hlatky et al. 2002). Diese Methode findet Anwendung in der experimentellen Effektivitätskontrolle nach antiangiogener Therapie. Die Kapazität eines Tumors die Bildung neuer Blutgefäße zu induzieren korreliert nicht immer mit seiner Malignität und auch der Zeitpunkt des angiogenen switch findet zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt. Dies könnte das Erstellen eines angiogenen Profils jedes einzelnen Tumors erfordern (Folkman 1990).

Ziel der Messung der Mikrogefäßdichte ist die Bestimmung des vaskulären Status eines Tumors. Auf Grund unterschiedlicher Untersuchungstechniken besteht aber eine erhebliche Schwankungsbreite zwischen den einzelnen Untersuchungsergebnissen, weshalb eine generelle Aussage zur Mikrogefäßdichte als Prognosefaktor unter Vorbehalt zu treffen ist.

#### **2.1.4. Anti-Angiogenese als zukunftsweisende Therapie solider Tumore**

Das Tumorstadium über die Manipulation der Angiogenese zu verhindern, ist ein viel versprechender Therapieansatz. Folkman definiert Anti-Angiogenese als Vorbeugung der Blutgefäßneubildung, wonach ein wachstumsunfähiger Residualtumor verbleibt (Folkman 1972). Wie bereits erörtert ist die Angiogenese ein komplexer Prozess, welcher auf verschiedenen Regulationsebenen potentielle Angriffspunkte bietet.

Da VEGF-A eine zentrale Rolle einnimmt, stehen Antikörper gegen VEGF-A und dessen Rezeptoren VEGFR-1 und -2 im Mittelpunkt der Forschung. Die erste klinische Zulassung erhielt der Angiogeneseblocker Bevacizumab (Avastatin®) im Februar 2004 für die Therapie des metastasierten Kolonkarzinoms. Über kompetitive Hemmung wird die Bindung von VEGF-A an seine Rezeptoren verhindert. Die Wirksamkeit bisheriger Polychemotherapien konnte durch den Zusatz des monoklonalen Antikörpers gesteigert werden. Es zeigte sich ein signifikanter Rückgang des Tumorstadiums, der Metastasierung sowie der Mikrogefäßdichte in 20 verschiedenen Tumorzelllinien (Gerber und Ferrara 2005). Weiterhin ist der Einsatz physiologischer Angiogeneseinhibitoren, darunter Thrombospondin, Angiostatin und Endostatin sowie synthetisch hergestellter Pilz- oder Bakterienstoffe wie AGM-147 (Fumagillin) in klinischer Erprobung (Bicknell 2002).

Zunehmend wird die Anti-Angiogenese als metronomische Therapie eingesetzt, wodurch Langzeiteffekte gesichert werden sollen, da nach Absetzen der antiangiogenen Therapie ein erneutes Gefäßwachstum beobachtet wurde. Neu ist der Gedanke tumorassoziierte Blutgefäße selektiv auf Grund spezifischer Oberflächeneigenschaften mittels zytotoxischer Substanzen anzugreifen.

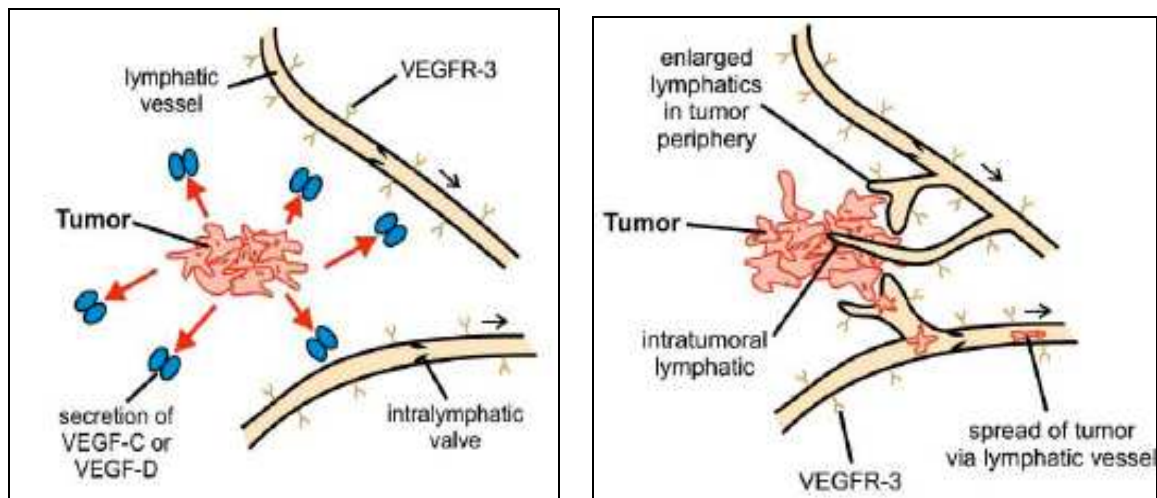
Die antivaskuläre Therapie führt über die Zerstörung der Gefäße zur Tumorzellnekrose (Tozer 2003). Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von Fibronektin sind bereits in Erprobung (Nilsson et al. 2001). Trotz aller Bemühungen bleibt die Anti-Angiogenese in vivo hinter den Erwartungen der experimentellen Ergebnisse zurück. Grund dafür scheinen der komplexe Steuerungsmechanismus und die Fülle unterschiedlicher Wachstumsfaktoren zu sein, welche durch Überschneidungen ein sich gegenseitig ergänzendes System darstellen.

## **2.2. Lymphgefäße in der aktuellen Gefäßforschung**

Das Lymphgefäßsystem durchzieht den Körper als dichtes Netzwerk. Die blind endenden Kapillaren verfügen über eine diskontinuierliche Basallamina und überlappende Interzellularkontakte. Neben der Regulation der Flüssigkeitshomöostase ist das Lymphgefäßsystem mit den zwischengeschalteten Lymphknotenstationen für die Antigenpräsentation und Immunzellproliferation unentbehrlich. Daneben stellen die Lymphgefäße eine Hauptroute der Tumormetastasierung und Ort der Lymphangiosa carcinomatosa dar.

Auf Grund der Fokussierung wissenschaftlicher Forschung auf das Blutgefäßsystem und aus Mangel an spezifischen Markern zur Darstellung der Lymphgefäße existieren bis heute nur unzureichende Informationen über die Entwicklung und das Wachstum der Lymphgefäße. Die hohe Frequenz mit welchen Tumoren in das Lymphgefäßsystem metastasieren macht deren Bedeutung für die Tumorprogression deutlich. Die Entdeckung spezifischer Lymphendothelzellmarker ermöglichte in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte in der Erforschung des Lymphgefäßsystems und den Mechanismen der Lymphangiogenese.

In Abbildung 2 ist die aktuelle Interpretation der lymphogenen Metastasierung dargestellt, wonach Tumor- und Stromazellen analog der Angiogenese lymphangiogene Wachstumsfaktoren sezernieren und die daraus resultierende Erweiterung des lymphatischen Fensters die Wahrscheinlichkeit des Eindringens für Tumorzellen in die Lymphgefäße steigert.



**Abb. 2** Von den Tumorzellen sezernierte lymphangiogene Wachstumsfaktoren, darunter VEGF-C und -D, regen vorbestehende Lymphgefäße zur Proliferation an. Zusätzlich bewirkt VEGF-C eine Lumenerweiterung der peritumoralen Lymphgefäße (Achen et al. 2005).

### 2.2.1. Die Wachstumsfaktoren der Lymphangiogenese

VEGF-C ist der erste identifizierte Wachstumsfaktor, welcher spezifisch auf Lymphendothelzellen wirkt (Joukov et al. 1996). Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit zu VEGF-A wurde VEGF-C in die Familie der VEGFs integriert. Als besonderes Merkmal gelten die C- und N-terminalen Erweiterungen. Die 58 kD schwere Vorstufe von VEGF-C wird schrittweise durch proteolytische Spaltung der C- und N-terminalen Enden in ihre reife funktionale Form überführt. Die Serinprotease Plasmin gilt als potenter Aktivator (McColl et al. 2003). Unprozessiert kann VEGF-C den VEGFR-3 binden. Die reife Form enthält Dimere der homologen Bindungsdomäne (VHD), durch welche die zusätzliche Bindung des VEGFR-2, dem wichtigsten Rezeptor der Angiogenese ermöglicht und die Affinität zu VEGFR-3 erhöht wird (Joukov et al. 1996).

Experimentelle Demonstrationen belegen, dass VEGF-C proliferative, anti-apoptotische und migratorische Signale über VEGFR-3 auf Lymphendothelzellen überträgt (Makinen et al. 2001). Die Überexpression in der Epidermis transgener Mäuse führte zur Hyperplasie und Proliferation der Lymphendothelzellen (Jeltsch et al. 1997). In vitro wirkt VEGF-C in prozessierter Form zusätzlich mitogen, chemotaktisch und permeabilitätssteigernd auf Endothelzellen und Blutgefäße. Diese Effekte werden vermutlich über den VEGFR-2 erzielt (Joukov et al. 1996).

VEGF-D entspricht in seiner Aminosäuresequenz zu 48% VEGF-C. Da nur VEGF-C und -D über C- und N-terminale Erweiterungen verfügen und als wichtigste Induktoren der Lymphangiogenese gelten, wird über die Zugehörigkeit zu einer Subfamilie diskutiert (Achen et al. 1998). VEGF-D wird ebenso initial als Preproprotein synthetisiert und in ähnlicher Weise wie VEGF-C prozessiert. Die reife Form bindet VEGFR-2 und VEGFR-3 mit erhöhter Affinität (Achen et al. 1998). Angiogene und lymphangiogene Wirkungen konnten für VEGF-D nachgewiesen werden. Allerdings wurde in VEGF-D deletionsmutanten Mäusen keine Störung der Lymphangiogenese beobachtet (Baldwin et al. 2005). Demnach kann der Funktionsverlust durch andere Wachstumsfaktoren kompensiert werden. VEGFR-3 wird im adulten Organismus auf Lymphendothelzellen exprimiert. Während der frühen Embryogenese ist der Rezeptor auf dem gesamten Endothel zu finden. Zu diesem Zeitpunkt vermittelt VEGFR-3 Signale für die Entwicklung des kardiovaskulären Systems. Ab dem 14.5 embryonalen Tag wird die Expression auf Lymphendothelzellen beschränkt. VEGFR-3 gilt als bedeutsamster Rezeptor in der Signaltransduktion der Lymphangiogenese und ist für die Reifung und Proliferation von Lymphendothelzellen verantwortlich (Veikkola et al. 2001). Die räumlich assoziierte Expression der VEGFs und ihren Rezeptoren lässt auf einen parakrinen Stimulationsmechanismus schließen.

### **2.2.2. Die Entwicklung spezifischer molekularer Lymphgefäßmarker**

Die Differenzierung zwischen Lymphgefäßen und Blutgefäßen stellt sich insbesondere für Kapillaren problematisch dar. Lymphgefäße weisen eine Instabilität im Verlauf der Gewebeaufarbeitung auf, weshalb in histologischen Schnitten durch das kollabierte Lumen eine Identifikation erschwert wird. Methoden, wie die Tuscheinjektion in vitale Lymphgefäße oder die elektronenmikroskopische Untersuchung, stellen aufwendige und nur begrenzt einsetzbare Verfahren dar. Im Zeitalter der Immunhistochemie stehen durch molekulare Marker neue und vielseitig einsetzbare Werkzeuge zur selektiven Darstellung von Gewebestrukturen zur Verfügung. Über die farbliche Kennzeichnung spezifischer Oberflächenmoleküle können die Gefäße im Gewebe sichtbar gemacht werden. Mit der Anfärbung einzelner Basallaminakomponenten, wie Laminin, Fibronectin und Typ IV Kollagen gelang die indirekte Differenzierung zwischen den beiden Gefäßtypen (Nerlich und Schleicher 1991). Durch die Entdeckung spezifischer Lymphendothelzellmarker konnte später der direkte Nachweis von Lymphgefäßen im Gewebe erfolgen.



Auf Grund des gemeinsamen embryonalen Ursprungs von Blut- und Lymphgefäßen wird eine Vielzahl von Oberflächenmolekülen auf beiden Gefäßtypen exprimiert.

Dies stellt, insbesondere unter pathologischen Bedingungen, eine besondere Problematik in der Etablierung selektiver Lymphendothelzellmarker dar. Im Laufe der Zeit werden stetig neue Moleküle identifiziert, die einer kritischen Prüfung bedürfen. Mit VEGFR-3 wurde 1998 erstmals von einem selektiv auf Lymphendothelzellen exprimierten Oberflächenmolekül berichtet (Jussila et al. 1998). Als Rezeptor für Wachstumsfaktoren kann VEGFR-3 zur Erforschung der Lymphangiogenese und zur Gefäßdifferenzierung in vaskulären Tumoren eingesetzt werden (Partanen et al. 1999). Weiterführende Studien in inflammatorisch und neoplastisch veränderten Geweben enthüllten die Expression auf neu gebildeten Blutgefäßen, weshalb die Selektivität eingeschränkt ist (Witmer et al. 2001).

Podoplanin ist ein 38 kD Membranprotein, welches erstmals 2001 auf glomerulären Podozyten entdeckt und im Weiteren als lymphspezifisch beschrieben wurde (Breiteneder-Geleff et al. 1997). Es wird angenommen, dass die Expression auf Endothelzellen im Angiosarkoma deren lymphogenen Ursprung anzeigt. Die genaue Funktion ist jedoch unbekannt. Die Defizienz von Podoplanin mündet in einem kongenitalen Lymphödem (Schacht et al. 2005). Podoplanin wird in der Differentialdiagnostik vaskulärer Tumoren und in der Bewertung der Lymphgefäßdichte eingesetzt (Ordonez 2006). Die in dieser Studie verwendeten neuen Lymphendothelzellmarker Lyve-1 und D2-40 werden im Weiteren einzeln besprochen.

#### **2.2.2.1. Lyve-1**

Der Lyve-1 Rezeptor (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1) ist ein 322 Aminosäuren langes integrales Typ I Membranprotein. Die 41%ige Homologie zu CD44 führte zu seiner Entdeckung, als weiteres Mitglied der Link Superfamilie mit typischer extrazellulärer Hyaluronbindungsdomäne (Banerji et al. 1999). Lyve-1 wird fast ausschließlich auf Lymphendothelzellen kleinerer Lymphgefäße und Lymphgefäßkapillaren exprimiert. Die Bindung und Internalisierung von Hyaluron, welches zu 80% über die Lymphgefäße aus dem Gewebe abtransportiert wird, erfolgt über den Lyve-1 Rezeptor (Prevo et al. 2001). Als Glycosaminoglycan ist Hyaluron ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix mit vielseitigen Funktionen für die Interaktion von Zellen während Embryogenese und Wundheilung.

Seit kurzem wird angenommen, dass Lyve-1 für die rezeptorvermittelte Migration von Leukozyten durch das Lymphendothel verantwortlich ist (Jackson et al. 2001). Darüber hinaus konnte Lyve-1 auf sinusoidalen Endothelzellen von Leber und Milz sowie auf dem Tubulusepithel der Niere nachgewiesen werden (Banerji et al. 1999). Neueste Studien zeigen weiterhin eine Expression auf aktivierten Gewebemakrophagen in inflammatorisch und neoplastisch verändertem Gewebe (Schledzewski et al. 2006) sowie auf hochendothelialen Venulen der Lymphknoten (Wrobel et al. 2005). Eine Kreuzreaktivität zu Blutgefäßen, Fibroblasten oder Epithelzellen im normalen und pathologisch veränderten Gewebe konnte bislang nicht nachgewiesen werden (Akishima et al. 2004). Lyve-1 zeigt somit ideale Voraussetzungen zur Identifikation und Quantifizierung von Lymphgefäßen im histologischen Routinematerial.

#### **2.2.2.2. D2-40**

Im Jahr 2002 beschrieben Kahn und Mitarbeiter erstmals die selektive Lymphgefäßdarstellung mittels D2-40. Es handelt sich um einen Antikörper, welcher selektiv das onkofetale M2A, ein fixierungsresistentes Epitop eines Sialoglykoproteins, erkennt (Kahn et al. 2002). M2A wird auf Lymphendothelzellen von Lymphkapillaren, Kollektoren und Sammelrohren exprimiert. Neben der Markierung von Lymphgefäßen wird D2-40 in der Diagnostik testikulärer Stammzelltumoren eingesetzt (Marks et al. 1999).

Weiterhin scheint D2-40 in der Differentialdiagnostik des Pleuramesothelioms nützlich zu sein (Ordonez 2005, Müller et al. 2006). Der Einsatz von D2-40 in der Bestimmung des Ursprungs vaskulärer Tumoren ist ebenso eine Anwendungsmöglichkeit (Kahn et al. 2002). Die von Kaiserling 2004 durchgeführte Studie zur Analyse D2-40 positiver Strukturen in normalen und pathologisch veränderten Geweben zeigte das weite Reaktionsspektrum von D2-40 auf. Insbesondere mesenchymale Zellen wie glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Myofibroblasten reagieren positiv. Außerdem wird über eine schwache Reaktion des Zytoplasmas sowie der Zellkerne von Stroma- und Tumorzellen, unter anderem für das orale Plattenepithelkarzinom, berichtet. Blutgefäßendothelzellen hingegen wurden nicht markiert. In dem Wissen über die Kreuzreaktivität scheint D2-40 für die Anfärbung und Differenzierung normaler, reaktiver und neoplastischer Lymphendothelzellen geeignet zu sein (Kaiserling 2004).

### **2.3. Mechanismen der Metastasierung solider Tumoren**

Das heutige Verständnis über die Verbreitung von Tumorzellen basiert auf der 1889 von Paget postulierten „seed and soil“ Hypothese (Paget 1889). Diese besagt, dass eine Tumorzelle eine Affinität zu einem Zielgewebe besitzt und nur auf diesem Nährboden zum Wachstum befähigt ist. Die aktuelle Interpretation formuliert zwei Grundprinzipien als Voraussetzungen der Metastasierung. Zum einen besteht der Tumor aus heterogenen Zellen (Fidler 2003). Diese Subpopulationen entstehen infolge des Selektionsdruckes durch genetische Mutationen (Nowell 1976). Dabei weisen die einzelnen Zellpopulationen unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich Morphologie, Wachstumsrate, Karyotyp, Chemosensitivität und der Fähigkeit zur Metastasierung auf (Fidler 2003). Zum Zweiten kommt der Interaktion von Tumorzellen mit der sie umgebenden extrazellulären Matrix, über die Schaffung eines optimalen Wachstumsmilieus, eine entscheidende Rolle zu (Fidler 2003). Die Metastasierung ist ein komplexer Prozess basierend auf genetischen Veränderungen und Zell-Matrix-Interaktionen. Im Lauf des invasiven Wachstums können sich einzelne Zellen durch den Verlust der Zell-Zell-Adhäsion aus dem Tumorverband lösen. Durch Sekretion proteolytischer Enzyme, wie Matrixmetalloproteasen werden Basalmembran und extrazelluläre Matrix degradiert.

Die Expression spezifischer Oberflächenmoleküle ermöglicht das Anheften an die extrazelluläre Matrix und die Migration sowie das Eindringen in die Gefäße. Im Gefäßsystem müssen die Zellen der körpereigenen Immunabwehr entgehen. Die Immunevasion kann über verschiedene Mechanismen, wie Fibrinummantelung und verminderte HLA (humanes Leukozytenantigen) Expression realisiert werden. Mittels spezifischer Adhäsionsmoleküle gelingt das Anheften und die Aktivierung des Zielendothels.

Nach der Retraktion der Endothelzellen erfolgt die Migration in die subendotheliale Extrazellulärmatrix und die Invasion in tiefer gelegenes Gewebe. Mikrometastasen, bestehend aus wenigen Zellen, proliferieren analog dem Primärtumor angiogeneseabhängig (Folkman 1990). Um einen Sekundärtumor zu etablieren müssen alle Schritte der Metastasierungskaskade überwunden werden. Die Realisierung gelingt nur 0,01% der zirkulierenden Tumorzellen (Hart und Fidler 1980). Zeitpunkt und Mechanismen der Metastasierung sowie deren Lokalisation zeigen eine große Variationsbreite. Hämatogene und lymphogene Metastasierung sind die primären Formen, wobei die Frage nach dem Zugang von Tumorzellen zu den Blut- und Lymphgefäßen bisher nicht aufgeklärt ist.

## **2.4. Zielstellung**

Gegenstand dieser Arbeit ist die gemeinsame standardisierte Erfassung der Lymph- und Blutgefäßdichte in formalinfixiertem paraffineingebettetem Gewebe pharyngealer Plattenepithelkarzinome. Durch die Korrelation zu bekannten histopathologischen Prognoseparametern, insbesondere zu der synchronen nodalen Metastasierung, soll die Bedeutung der Lymphgefäßdichte für dieses Karzinom bestimmt werden.

### Teilaspekte

1. Immunhistochemische Darstellung von Lymphgefäßen in neoplastischem und nicht neoplastisch verändertem Gewebe des Pharynx mittels Lyve-1 und D2-40.
2. Immunhistochemische Darstellung von Blutgefäßen unter Verwendung des Endothelzellmarkers FVIII als bekanntes prognoserelevantes Verfahren.
3. Quantitative Bewertung der Blut- und Lymphgefäßdichte in Invasionszone und zentralen Anteilen pharyngealer Plattenepithelkarzinome sowie in nicht neoplastisch verändertem Gewebe.
4. Korrelation von Blut- und Lymphgefäßdichte zu bekannten histopathologischen Prognoseparametern.
5. Evaluierung der Blutgefäßdichte in Korrelation zur Lymphgefäßdichte.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Gewebematerial

Untersucht wurde das Resektionsgewebe von 57 pharyngealen Plattenepithelkarzinomen. 44 Präparate stammen aus dem Oropharynx und 13 aus dem Hypopharynx. 9 Patienten waren weiblichen und 48 männlichen Geschlechts. Zusätzlich erfolgte die Begutachtung von nicht neoplastisch verändertem Gewebe. Dieses stammt aus 2 Tonsillektomiepräparaten und 5 tumorfreien Resektaträndern aus 3 pharyngealen Karzinomen und 2 Laryngektomiepräparaten. Alle Präparate entstammen der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde und dem Institut für Pathologie des HELIOS-Klinikums Erfurt aus dem Zeitraum von 2002 bis 2007. Die Bewertung der Histologie erfolgte nach einheitlichen Standards. Eine Übersicht bezüglich der Ausdehnung des Primärtumors (pT), der nodalen Metastasierung (pN) und des Gradings (G) im Patientenkollektiv geben Tabelle 1, 2 und 3. Eine Invasion der Lymphgefäße (L1) bestand in 11 Fällen und konnte in 18 Fällen (L0) ausgeschlossen werden. In 27 Fällen (Lx) erfolgte keine Bewertung der Lymphgefäßinvasion. Die klinische Diagnose wurde durch eine konventionelle Histologie lichtmikroskopisch gesichert.

**Tab.1 T-Kategorie (pT) der untersuchten Plattenepithelkarzinome**

<b>T-Stadium</b>	<b>Tis</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4a</b>	<b>T4b</b>
Patientenzahl	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>31</b>	<b>13</b>	<b>2</b>	<b>0</b>

**Tab.2 Nodale Metastasierung (pN) der untersuchten Plattenepithelkarzinome**

<b>N-Stadium</b>	<b>N0</b>	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>N2a</b>	<b>N2b</b>	<b>N2c</b>	<b>N3</b>	<b>N+</b>
Patientenzahl	<b>22</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>16</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>34</b>

**Tab.3 Grading (G) der untersuchten Plattenepithelkarzinome**

<b>Grading</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>
Patientenzahl	<b>4</b>	<b>33</b>	<b>18</b>	<b>1</b>

### **3.2. Klassifikation pharyngealer Plattenepithelkarzinome**

Die Einteilung pharyngealer Plattenepithelkarzinome erfolgt anhand der Lokalisation sowie durch Typing, Grading und Staging. Diese Parameter stellen die Basis für die Einschätzung der Prognose und die Entscheidung über die Therapiestrategie dar.

#### **3.2.1. Lokalisation**

Karzinome des Pharynx werden nach UICC (Union International contre le Cancer) in drei anatomische Bezirke unterteilt: Nasopharynx, Oropharynx und Hypopharynx.

Zur genaueren Tumorlokalisation können weitere Unterbezirke zugeordnet werden, welche mit Hilfe des ICD-10 Codes verschlüsselt werden. Innerhalb des Oropharynx befinden sich die Karzinome im Bereich des hinteren Drittels des Zungengrundes, den Valleculae und den Tonsillen, der Fossa tonsillaris und den Gaumenbögen sowie in der Glossotonsillarfurche. Weiterhin auf der oralen Oberfläche des weichen Gaumens, der Uvula und der Pharynxhinterwand in Höhe des Oropharynx. Zum Hypopharynx werden Karzinome des pharyngoösophagealen Überganges, des Sinus piriformis und der Pharynxhinterwand, in Höhe des Hypopharynx, gezählt (Wittekind et al. 2002).

#### **3.2.2. Typing**

Nach der Welt-Gesundheits-Organisation (Barnes et al. 2005, WHO 2005) werden pharyngeale Plattenepithelkarzinome auf Grund unterschiedlicher Wachstumseigenschaften in folgende morphologische Varianten unterteilen.

- normales Plattenepithelkarzinom, darunter das Carcinoma in situ (Cis), das mikroinvasive Plattenepithelkarzinom und das invasive Plattenepithelkarzinom
- verukköses Plattenepithelkarzinom
- basaloides Plattenepithelkarzinom
- papilläres Plattenepithelkarzinom
- akantolytisches Plattenepithelkarzinom
- adenomatöses Plattenepithelkarzinom

### **3.2.3. Grading**

Das Grading ermöglicht anhand des histologischen Präparates eine Aussage zum Malignitätsverhalten eines Tumors zu treffen. Die Methode wurde erstmals von Broders zur Bewertung des oralen Plattenepithelkarzinoms beschrieben (Broders 1920). Das Verhältnis differenzierter zu undifferenzierten Zellen stellt die Grundlage dieses Bewertungssystems dar. Während die Arbeitsgruppe von Broders die Histologie des gesamten Tumors betrachtete, konnten Bryne und Mitarbeiter zeigen, dass das Grading der Invasionszone oraler Plattenepithelkarzinome eine höhere prognostische Aussagekraft besitzt (Bryne et al. 1992). Bis heute existiert kein einheitliches Gradingssystem für Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region. Das hier verwendete Grading orientiert sich an den Vorgaben der UICC (Wittekind et al. 2002). Danach können Karzinome als gut differenziert (G1), mäßig differenziert (G2), schlecht differenziert (G3) sowie undifferenziert bzw. anaplastisch (G4) eingestuft werden. Wobei ein hoher Differenzierungsgrad (G1/2) als prognostisch günstig zu bewerten ist. Die Zuordnung erfolgt über die Bewertung fünf morphologischer Kriterien in den am wenigsten differenzierten Anteilen, dazu zählen: Grad der Keratinisierung, Kernpolymorphismus, Anzahl der Mitosen, Struktur der Invasionszone und Intensität der Entzündungsreaktion.

### **3.2.4. TNM-Klassifikation**

Die anatomische Ausdehnung der Tumorerkrankung wird anhand der Ausbreitungsklassifikation nach der UICC bestimmt (Wittekind et al. 2002). Dabei werden die lokale Ausdehnung des Primärtumors (T), der Befall regionaler Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) getrennt voneinander bestimmt und in der Tumormformel (TNM) zusammengefasst. Die Bewertung kann sowohl klinisch (c) durch manuelle Untersuchung, Endoskopie und bildgebende Verfahren, als auch histopathologisch (p), durch makroskopische und mikroskopische Gewebebegutachtung, erfolgen.

Als zusätzlicher Parameter kann die Lymphgefäßinfiltration (L) bestimmt werden. Die aktuell gültigen UICC Kriterien für Karzinome des Oro- und Hypopharynx sind Tabelle 4 zu entnehmen.

**Tab. 4** TNM Klassifikation für Oropharynx- und Hypopharynxkarzinome (Wittekind et al. 2002)

<b>c/pT</b>	<b>Ausdehnung des Primärtumors</b>
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Tumor nachweisbar
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor $\leq 2$ cm in größter Ausdehnung oder auf Unterbezirke des Hypopharynx beschränkt
T2	Tumor 2 – 4cm in größter Ausdehnung oder mehr als ein Unterbezirk des Hypopharynx betroffen, ohne Fixation des Hemilarynx
T3	Tumor $\geq 4$ cm in größter Ausdehnung oder mit Fixation des Hemilarynx
T4a	Infiltration der Nachbarstrukturen: Larynx, äußere Zungenmuskulatur, Lamina medialis des Procc. pterygoideus, harter Gaumen, Unterkiefer, Schild-/Ringknorpel, Zungenbein, Schilddrüse, Ösophagus, zentrale Halsweichteile
T4b	Infiltration der Nachbarstrukturen: M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Procc. pterygoideus, Schädelbasis, A. carotis interna, prävertebrale Faszie, mediastinale Strukturen
<b>c/pN</b>	<b>Regionäre Lymphknoten</b>
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
cN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN0	Nach selektiver Neck-Dissektion und Histologie von $\geq 6$ Lymphknoten bzw. radikaler oder modifizierter Neck-Dissektion und Histologie $\geq 10$ Lymphknoten keine Infiltration nachweisbar
N1	Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten $\leq 3$ cm in größter Ausdehnung
N2	Lymphknotenmetastasen spezifiziert nach Na, Nb und Nc
N2a	Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten 3 – 6 cm in größter Ausdehnung
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten $\leq 6$ cm in größter Ausdehnung
N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten $\leq 6$ cm in größter Ausdehnung
N3	Lymphknotenmetastase(n) $\geq 6$ cm in größter Ausdehnung



<b>c/pM</b>	<b>Fernmetastasen</b>
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden
<b>pL</b>	<b>Lymphgefäßinvasion</b>
Lx	Lymphgefäßinfiltration kann nicht beurteilt werden
L0	Keine Lymphgefäßinfiltration
L1	Lymphgefäßinfiltration

### 3.3. Paraffineinbettung und konventionelle Histologie

Unmittelbar nach der operativen Entfernung wurde das Tumorgewebe in einer 4%igen PBS-gepufferten (Phosphate buffered saline) Formaldehydlösung für 24 Stunden fixiert. Anschließend in 50°C heißem Paraffin (Pastillen, Vogel, Deutschland) mittels Einbettautomaten (Tissue TEK® VIP, Sakura, Deutschland) eingebettet und über die Ausgießstation (Paraffin-Ausgieß-Station EG 1150 C+H, Leica, Deutschland) in Blöckchen gegossen.

Von diesen Blöckchen angefertigte 4µm dicke Paraffinschnitte (Schlittenmikrotom, Microm, Deutschland) wurden für 25min bei 60°C im Trockenschrank (TDO66, medite, Deutschland) getrocknet. Im Färbeautomaten (Multifärbeautomat DRS 2000, Sakura, Deutschland) wurden die Schnitte dann wie folgt entparaffinisiert: Spülung mit Xylol für 2 x 2:30min, mit 100%igem Alkohol für 2:30min und mit 96%igem Alkohol sowie 70%igem Alkohol für jeweils 1min. Zur Anfertigung der konventionellen Histologie erfolgte die Kernfärbung mit Hämalaun nach Meyer (6g Hämatoxylin, 0,4g Natriumjodat, 100g Kalialaun, 100g Chloralhydrat, 2g Zitronensäure auf 2000ml Aqua destillium). Daran schloss sich eine 3minütige Färbung in alkoholischer Eosin-Y-Lösung (10g Eosin, 8 Tropfen konzentrierte Essigsäure, auf 100ml Aqua destillium) an.

Abschließend wurden die Präparate über eine aufsteigende Alkoholreihe wieder in Xylol überführt und im Eindeckautomaten (SCA – 5600, Sakura, Deutschland) mit einem dreischichtigen Film überzogen.

### 3.4. Immunhistochemie

Der selektive immunhistochemische Nachweis spezifisch im histologischen Schnitt gebundener Antikörper erfolgte mittels LSAB-Methode (Labelled-StreptAvidin-Biotin Methode).

#### 3.4.1. Vorbehandlung des Gewebes

Zur Vorbehandlung wurden die 4µm dicken Gewebeschnitte wie folgt entparaffinisiert: in Xylol für 3 x 5min, in 100%igem Alkohol für 2 x 5min sowie in 90% und 70%igem Alkohol für jeweils 1 x 5min. Anschließend erfolgte eine Spülung mit destilliertem Wasser. Die Freilegung der Epitope im Gewebe erfolgte mittels hitzeinduzierter Epitopdemaskierung. Dazu wurden die Gewebeschnitte im auf 94°C aufgewärmten Dampfgarer (Multi Gourmet Dampfgarer, Braun, Deutschland) für 30min bei 99°C gekocht und anschließend in einer für jeden Antikörper spezifischen Demaskierungslösung (Tab.5) für 20min abgekühlt. Die Färbung mit F8/86 erforderte zusätzlich die enzymatische Andauung des Gewebes mit Proteinkinase K (Proteinkinase K, Dako, Dänemark).

**Tab. 5.** Verdünnung und Einwirkzeit der Demaskierungslösungen für die verwendeten Antikörper.

<b>Antikörper -Klon</b>	<b>hitzeinduzierte Epitopdemaskierung</b>
Lyve-1	pH 6,1 in Target Retrieval Solution (S1699, 1:10, Dako, Dänemark) für 20min
D2-40	pH 9 in Target Retrieval Solution (S2367, 1:10, Dako, Dänemark) für 20min
F8/86	pH 6,1 in Target Retrieval Solution (S3020, 1:10, Dako, Dänemark) für 10min

#### 3.4.2. Primäre Antikörper

Die Spezifität der verwendeten Antikörper ist aus dem Schrifttum bekannt. Das erkannte Gewebeantigen sowie der Antikörperklon, Verdünnung, Herkunft und Literaturquellen zu den einzelnen Antikörpern sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

**Tab. 6:** Übersicht über das zu erkennende Antigen, Verdünnung, Bezugsquelle und Literatur der verwendeten Antikörpern Lyve-1, D2-40 und F8/86.

Antigen	Antikörper-Klon	Verdünnung	Firma	Referenz
Lyve-1	LYVE-1 Polyklonales Kaninchen IgG	1:40	DCS, Deutschland	Banerji et al. 1999 Jackson et al. 2001
MW40K	D2-40 Monoklonales Maus IgG1	1:100	SIGNET, USA	Kahn et al. 2002
vWF	F8/86 Monoklonales Maus IgG1	1:200	DakoCytomation, Dänemark A/S	McComb et al. 1982

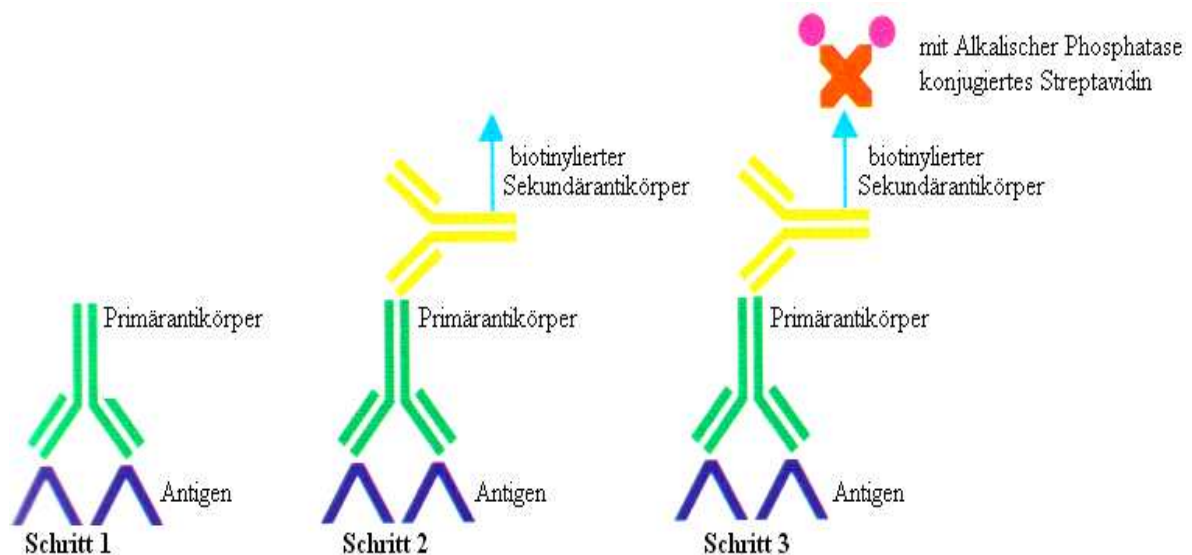
### 3.4.3. Die LSAB-Methode

Die LSAB-Methode beruht auf einem in drei Schritten realisierten indirekten Antigennachweis (Abb.3). Giorno zeigte, dass diese Methode die bisher höchste Sensitivität im Vergleich zu analogen immunhistochemischen Verfahren wie beispielsweise der APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase-Methode) besitzt (Giorno et al. 1984). Die LSAB-Methode wurde mittels zertifiziertem Dako REAL Detektions System K5005 Autostainer durchgeführt.

Im ersten Schritt wurde das Gewebe mit einem optional verdünnten unkonjugiertem Primärantikörper (Tab.6), (Antibody Diluent S2022, Dako, Dänemark) für 30-60min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte, über die Zugabe des Detektionskits (K5005, Dako, Dänemark), für 20min die Färbung der Schnitte.

Der Detektionskit enthielt den mit Biotin markierten Sekundärantikörper (Biotinylated Secondary Antibodies, Dako, Dänemark). Dieser, auch als Brückenantikörper bezeichnet, ist gegen das Fab Fragmente des Primärantikörpers gerichtet und dient der Vernetzung des Primärantikörpers mit dem Enzymmarkierten Streptavidin. Im dritten Schritt erfolgte, ebenfalls für 20min, die Inkubation des mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Streptavidin (Streptavidin Alkaline Phosphatase, Dako, Dänemark), welches mit hoher Affinität das kovalent vernetzte Vitamin Biotin des Sekundärantikörpers bindet.

Die 8minütige Applikation der Substrat-Chromogen-Lösung (Chromogen RED, Dako, Dänemark) führte dann zur Bildung eines Präzipitates am Ort des Antigen-Antikörper-Komplexes. Um das Farbergebnis zu optimieren, wurde die Substrat-Chromogen-Lösung ein zweites Mal für 8min appliziert. Lichtmikroskopisch konnte das Zielantigen durch die entstandene kontrastreiche Rotfärbung identifiziert werden. Zwischen den einzelnen Inkubationen wurden die Schnitte gründlich mit Waschpuffer gespült (Autostainer Buffer S3006, 1:10 verdünnt, Dako, Dänemark). Abschließend erfolgte die Kernfärbung mit Hämatoxylin (S2020, Dako, Dänemark). Nach einer letzten Spülung mit Wasser wurden die Gewebeschnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe in Xylol überführt und mittels Eindeckautomaten (Tissue-Tek-SCA, Vogel, Deutschland) mit einem Film überzogen.



**Abb. 3** zeigt die einzelnen Schritte des Antigennachweises mittels LSAB-Methode (modifiziert nach Boenisch et al. 2003, DakoCytomation)

#### 3.4.4. Bewertung der Immunreaktion

Die lichtmikroskopische Auswertung und photographische Dokumentation der immunhistologischen Befunde erfolgten mittels Lichtmikroskop (BX50, OLYMPUS, Japan) und Kamera (U-ULH, Olympus, Japan). Orientierend an der Vorgehensweise der Bewertung der Mikrogefäßdichte von Noel Weidner (Weidner 1995a), wurden die gefärbten Schnitte bei 40 und 100facher Vergrößerung untersucht, um die Bereiche mit der höchsten

Gefäßdichte, die hotspots, zu identifizieren. Pro Präparat wurden jeweils 5 repräsentative Messfelder in der Invasionsfront sowie in den zentralen Anteilen des Tumors ausgewählt. Mit 200facher Vergrößerung erfolgte die quantitative Auswertung der mittels LSAB-Methode markierten Blut- und Lymphgefäße. Die Gefäßdichte wurde als die mittlere Anzahl markierter Gefäße pro 200x Feld jeweils für Blut- und Lymphgefäße sowie Invasionsfront und zentrale Anteile für jeden Tumor einzeln angegeben. Die Auszählung fand ohne Kenntnis der jeweiligen Tumorstadien statt.

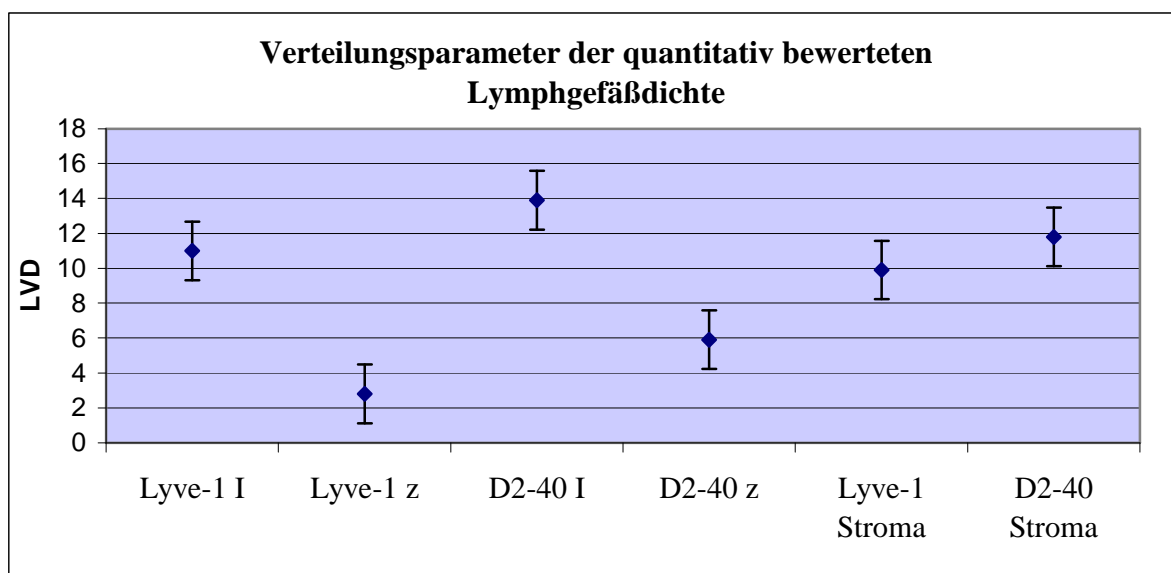
### **3.5. Statistische Auswertung**

Zur Auswertung der Messergebnisse wurden das arithmetische Mittel sowie der Standardfehler berechnet. Die statistische Analyse möglicher Zusammenhänge zwischen der quantitativ bewerteten Blut- und Lymphgefäßdichte und der Tumorausbreitungs-klassifikation sowie dem Grading wurde mittels exakten Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests (U-Test) für ungepaarte Stichproben durchgeführt. Vorteil des exakten Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests ist seine Anwendbarkeit im Rahmen kleiner Stichprobenumfänge. Um eine Abhängigkeit auf dem Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  (einseitige und zweiseitige Fragestellung) zu prüfen, wurde der p-Wert berechnet. Das Ergebnis galt als signifikant, wenn  $p \leq 0,05$ . Die Bewertung der Zusammenhänge zwischen der Blutgefäßdichte und der Lymphgefäßdichte erfolgte durch eine Korrelationsanalyse zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson. Weiterhin wurde eine binär logistische Regressionsanalyse, zur Auswertung der prognostischen Wertigkeit der einzelnen Parameter, durchgeführt. Alle Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 14.0 für Windows (Microsoft, USA) und Microsoft Excel (Microsoft, USA) durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Qualitative und quantitative Auswertung der Lymphgefäßdichte

Mit spezifischer Immunhistochemie markierte Lymphgefäße stellten sich durch eine kontrastreiche Rotfärbung der Lymphendothelzellen dar. Der Großteil der Lymphgefäße wies sichtbare Gefäßlumina, teils mit Lymphozyten gefüllt, auf (Abb.6, 7). Größere Ansammlungen von Lymphgefäßen, die hotspots, fanden sich vorwiegend in der Invasionszone. 82 % der Karzinome wiesen in den zentralen Anteilen Lymphgefäße auf (Anzahl n = 36 für Lyve-1; n = 42 für D2-40). Diese erschienen gehäuft mit kollabiertem Lumen, als schmaler Endothelsaum (Abb.8). Insbesondere Karzinome mit einem hohen Anteil an Bindegewebe wiesen intratumorale Lymphgefäße auf. Mittelwerte und Standardfehler ( $\pm$  SE) der Lymphgefäßdichte (LVD; lymphatic vessel density), gesondert für Invasionszone (I) und zentrale Anteile (Z) und jeweils für die Antikörper Lyve-1 und D2-40 sind Abbildung 4 zu entnehmen. Die Lymphgefäßdichte der Invasionszone ist gegenüber den zentralen Anteilen annähernd um das Dreifache erhöht (75 % für Lyve-1; 48 % für D2-40).



**Abb.4 :** Verteilungsparameter (Mittelwert  $\pm$  SE) der Lymphgefäßdichte (LVD), für die Lymphendothelzellmarker Lyve-1 und D2-40, in der Invasionszone (I) und den zentralen Anteilen (Z) der untersuchten Plattenepithelkarzinome sowie für nicht neoplastisch verändertes Stroma der Kopf-Hals-Region.

Da Karzinome der pT1 Kategorie als mikroinvasiv definiert über keine zentralen Anteile verfügen, wurde in diesen Fällen ( $n = 10$ ) ausschließlich die Invasionszone bewertet. Das Carcinoma in situ zeigte eine peritumorale Lymphgefäßdichte von 15,8 für Lyve-1 und 21,2 für D2-40. Da es sich um einen exemplarischen Fall handelt, kann dieser nicht in die schließende Statistik einbezogen werden.

#### 4.1.1. Expressionsmuster der Lymphendothelzellmarker

Die spezifischen Lymphendothelzellmarker Lyve-1 und D2-40 ermöglichen die selektive immunhistochemische Darstellung von Lymphgefäßen in formalinfixiertem paraffin-eingebettetem Gewebe. Dies gelang, mit unterschiedlicher Intensität. Der Antikörper D2-40 erfasste in den zentralen und peritumoralen Anteilen eine größere Anzahl von Lymphgefäßen als Lyve-1 (Abb.7). In mehreren Fällen konnte in den mit D2-40 gefärbten Schnitten eine Anfärbung von Zellmembran und Zytoplasma von Stroma- und Tumorzellen beobachtet werden (Abb.9, 10). Blutgefäße zeigten in wenigen Fällen eine schwach positive Reaktion.

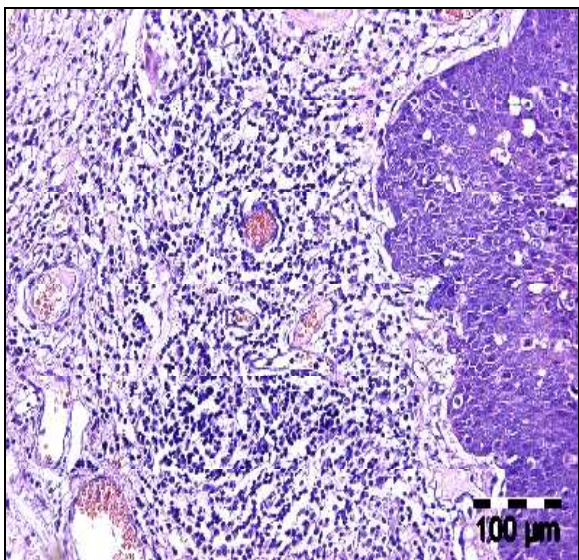


Abb. 5

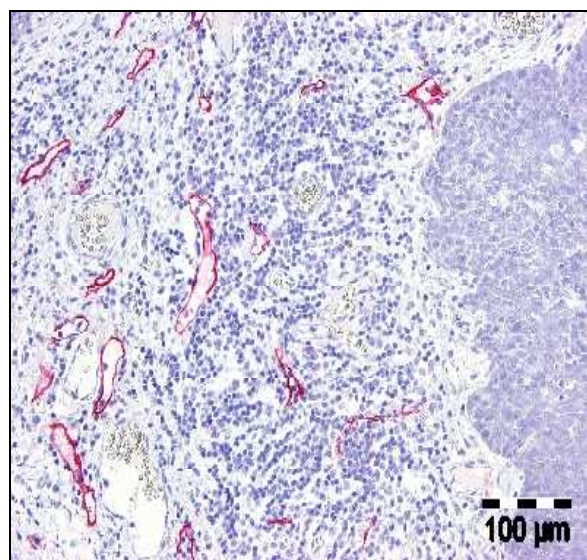


Abb. 6

**Abb. 5-6:** Ausschnitt aus der Invasionszone eines oropharyngealen Plattenepithelkarzinoms (Abb.5; H.E). Die Lymphgefäßdichte kann nicht sicher beurteilt werden. Abb.6: Immunhistochemische Erfassung der Lymphgefäßdichte mittels Lyve-1. Die Lumina und das einschichtige Endothel der Lymphgefäße sind durch die kontrastreiche Rotfärbung gut zu erkennen. Blutgefäßkapillaren sind negativ.



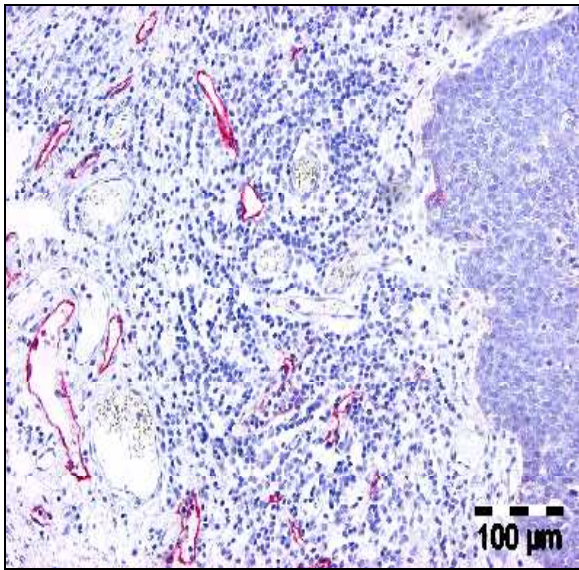


Abb. 7

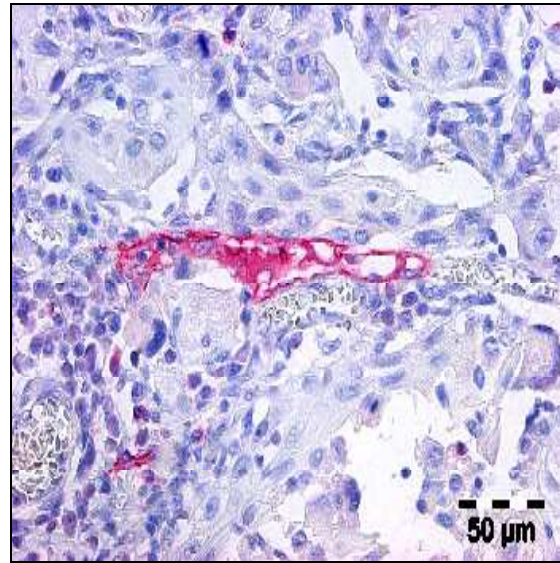


Abb. 8

**Abb. 7:** Serienschnitt in Korrespondenz zu Abb.5-6, die Lymphendothelzellen sind mit dem Antikörper D2-40 markiert. Im Vergleich zu Abb. 6 zeigen sich analoge Lymphgefäßmarkierungen, so dass beide Antikörper zur Darstellung von Lymphgefäßen in pharyngealen Plattenepithelkarzinomen geeignet sind. **Abb. 8:** zeigt ein, von den Karzinomzellen komprimiertes, intratumorales Lymphgefäß.

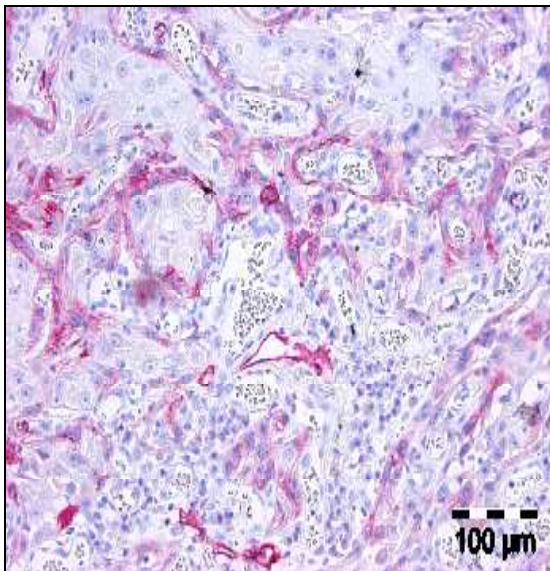


Abb. 9

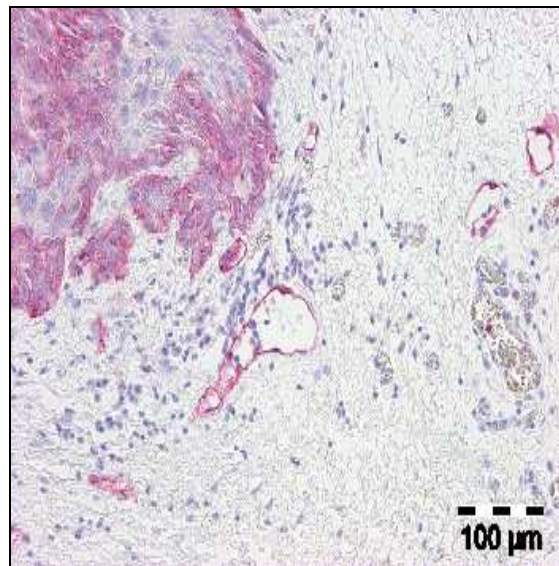


Abb. 10

**Abb. 9, 10:** Markierung von Lymphgefäßen in pharyngealen Plattenepithelkarzinomen mittels D2-40. Sowohl Zellmembran, als auch Zytoplasma von Stroma- und Karzinomzellen zeigten in unterschiedlicher Intensität eine unerwünschte Kreuzreaktivität.

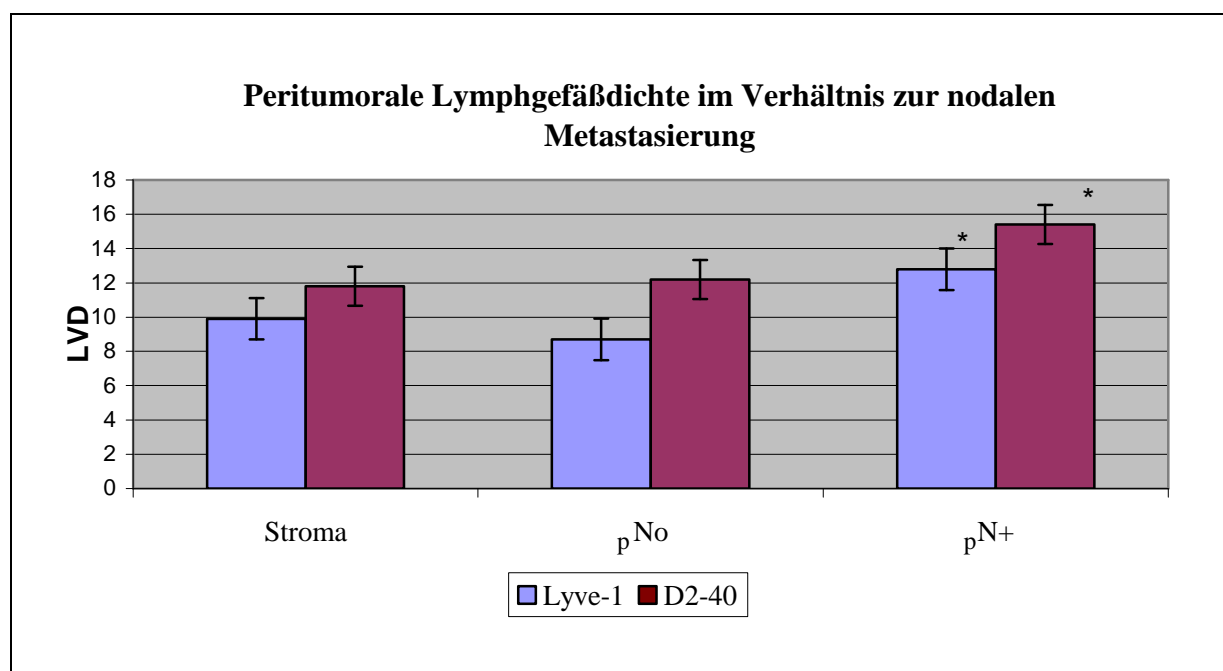


#### **4.1.2. Vergleich der Lymphgefäßdichte von nicht neoplastisch verändertem Stroma mit pharyngealen Plattenepithelkarzinomen**

Die Bewertung des Stromas erfolgte subepithelial in den Regionen der höchsten Lymphgefäßdichte. In dem nicht neoplastisch veränderten Gewebe des Pharynx stellte sich die Lymphgefäßdichte wie in Abb. 4 ersichtlich dar. Im Vergleich zu der Lymphgefäßdichte nicht metastasierter Karzinome konnte eine gering erhöhte Lymphgefäßdichte für Lyve-1 und kein Unterschied der Lymphgefäßdichte für D2-40 festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigte der Vergleich der Lymphgefäßdichte des Stromas zu metastasierten Karzinomen für beide Marker eine deutlich erhöhte Lymphgefäßdichte in nodal metastasierten Karzinomen. Diese Unterschiede konnten nicht als signifikant bewertet werden (pN0 8,4 vs. Stroma 9,91 vs. pN+ 12,8 für Lyve-1; pN0 11,8 vs. Stroma 11,8 vs. pN+ 15,4 für D2-40; Abb.12). Sowohl in metastasierten als auch in nicht metastasierten Karzinomen stellte sich die intratumorale Lymphgefäßdichte geringer dar als für das nicht neoplastische Stroma. Der Vergleich der Lymphgefäßdichte in Abhängigkeit der pT-Kategorie (Abb.13) zeigt einen Anstieg für das Cis sowie die pT2 und pT3 Kategorie gegenüber dem Stroma.

#### **4.1.3. Vergleich der Lymphgefäßdichte zur nodalen Metastasierung**

Die peritumorale Lymphgefäßdichte metastasierter Karzinome aller pT-Kategorien stellte sich im Durchschnitt höher dar als für nicht metastasierte Karzinome (Abb.11). Dieser Unterschied konnte für beide Marker als signifikant bestätigt werden (p=0,04 Lyve-1, p=0,034 D2-40). Zur exakteren Auswertung erfolgte eine weitere Signifikanzprüfung innerhalb der einzelnen pT-Kategorien für pT2 und pT3 Karzinome. Auch hier konnte ein signifikanter Unterschied (pT2 p=0,012; pT3 p=0,023 Lyve-1; pT3 p=0,023 D2-40) zwischen metastasierten und nicht metastasierten Karzinomen nachgewiesen werden. In den zentralen Anteilen wies die mittels Lyve-1 bewertete Lymphgefäßdichte analog der Invasionszone einen Anstieg von im Mittel 1,8 auf 3,5 in der Gruppe der metastasierten Karzinome auf. Dieser Unterschied konnte nicht als signifikant gesichert werden. D2-40 markierte Lymphgefäße zeigten zentral einen geringen Abfall von 6,1 in nicht metastasierten auf 5,7 in metastasierten Karzinomen. Pharyngeale Plattenepithelkarzinome mit nodaler Metastasierung zeigen somit eine signifikant erhöhte Lymphgefäßdichte der Invasionszone gegenüber nicht metastasierten Karzinomen.

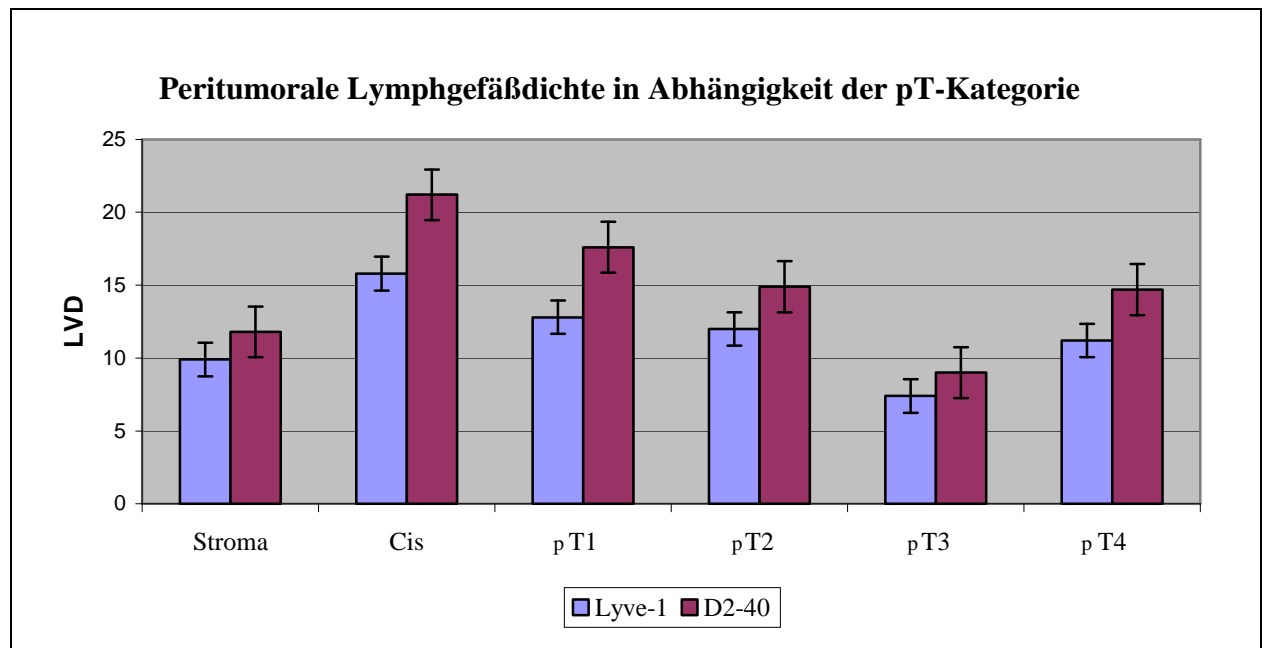


**Abbildung 11 :** Verteilungsmuster (Mittelwert  $\pm$  SE) der quantitativ bewerteten Lymphgefäßdichte von nicht neoplastischem Stroma und Karzinomen mit (pN+) und ohne (pNo) nodaler Metastasierung. Der Unterschied der Lymphgefäßdichte zwischen den Karzinomen mit und ohne nodaler Metastasierung konnte als signifikant \* ( $p=0,04$  Lyve-1,  $p=0,034$  D2-40) gesichert werden.

#### 4.1.4 Vergleich der Lymphgefäßdichte zur T-Kategorie

Die peritumorale Lymphgefäßdichte zeigte einen Abfall von Karzinomen der pT1/2 Kategorien zu Karzinomen der pT3/4 Kategorien (Abb.12). Dieser Unterschied stellte sich für beide Lymphendothelzellmarker als signifikant dar ( $p=0,012$  Lyve-1,  $p=0,004$  D2-40). Das mikroinvasive Karzinom (pT1) zeigte die höchste Lymphgefäßdichte ( $x=12,8$  Lyve-1,  $x=17,6$  D2-40), wohingegen das invasive Karzinom der pT3 Kategorie die niedrigste Lymphgefäßdichte ( $x=7,4$  Lyve-1,  $x=9,0$  D2-40) aufwies.

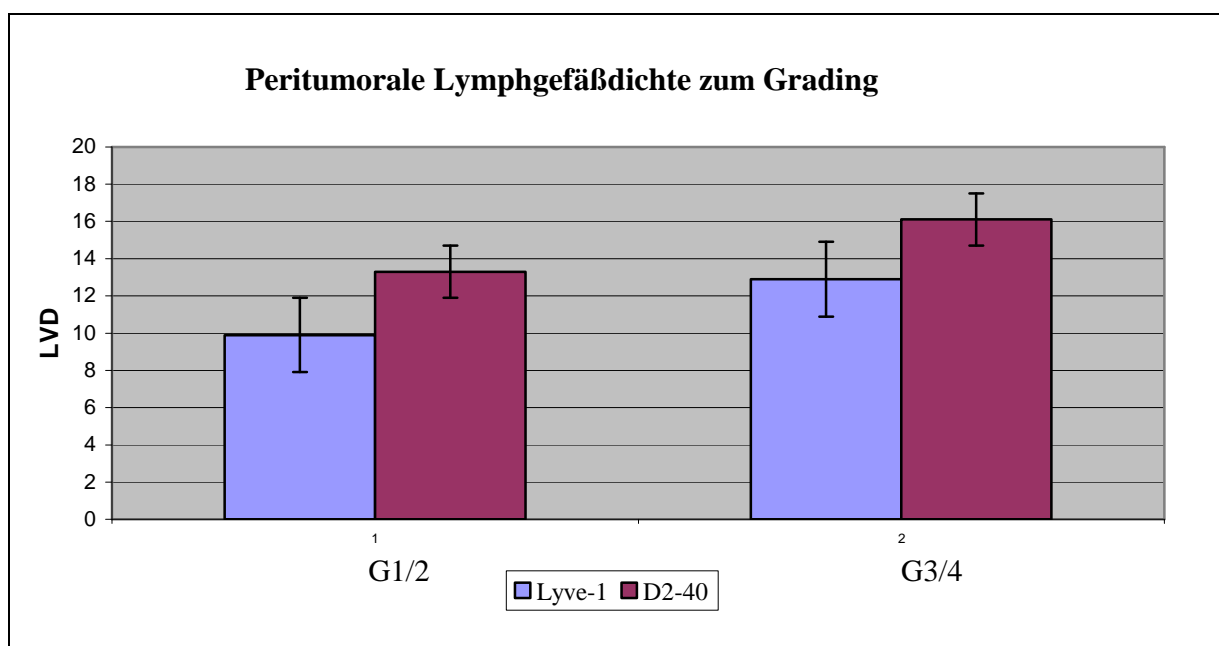
Der Unterschied zwischen dem mikroinvasiven Karzinom (pT1) und den invasiven Karzinomen (pT 2-4) konnte für die mittels D2-40 bestimmte Lymphgefäßdichte als signifikant gesichert werden ( $p=0,020$ ). Karzinome niedriger pT-Kategorie (pT1/2) zeigten auch in den zentralen Anteilen eine höhere Lymphgefäßdichte, als Karzinome hoher Ausdehnung (pT3/4). Da  $p \geq 0,05$  ist dieser Unterschied für beide Lymphgefäßmarker in den zentralen Anteilen nicht signifikant (Ergebnisse im Einzelnen nicht dargestellt). Pharyngeale Plattenepithelkarzinome weisen folglich bereits in frühen Tumorstadien eine erhöhte Lymphgefäßdichte auf.



**Abb. 12:** Darstellung der peritumoralen Lymphgefäßdichte (Mittelwert  $\pm$  SE) für die Marker Lyve-1 und D2-40, von nicht neoplastisch verändertem Stroma der Kopf-Hals-Region und pharyngealen Plattenepithelkarzinomen aufsteigender pT-Kategorie.

#### 4.1.5. Vergleich der Lymphgefäßdichte zum Grading

Die Lymphgefäßdichte der Invasionszone stellte sich in gut bis mäßig differenzierten Karzinomen G1/2 geringer dar als in schlecht und undifferenzierten Karzinomen G3/4 (Abb.13). Dieser Zusammenhang konnte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests für Lyve-1 als signifikant ( $p = 0,014$ ) bestätigt werden. Die Betrachtung der histopathologischen Grade im Einzelnen zeigte eine inhomogene Verteilung der Lymphgefäßdichte in Abhängigkeit des verwendeten Markers. Mit D2-40 markierte gut differenzierte Karzinome (G1) wiesen mit im Mittel 17,6 Lymphgefäßen die höchste, wohingegen für Lyve-1 mit im Mittel 8,6 Lymphgefäßen die niedrigste Lymphgefäßdichte gezählt wurde. In Bezug auf den Zusammenhang der zentralen Lymphgefäßdichte mit dem Grading konnten keine Signifikanzen zwischen der Gruppe mit niedrigem G1/2 und der Gruppe mit hohem histopathologischen Grad G3/4 gesichert werden. Auch hier wiesen gut differenzierte Karzinome für D2-40 die höchste Lymphgefäßdichte auf. Während die Lymphgefäßdichte für Lyve-1 einen Anstieg in schlecht bis undifferenzierten Karzinomen G3/4 zeigte, wies die Lymphgefäßdichte für D2-40 einen geringen Abfall auf. Somit nahm die peritumorale Lymphgefäßdichte der pharyngealen Plattenepithelkarzinome mit zunehmendem Grading ab.



**Abb. 13:** Lymphgefäßdichte (Mittelwert  $\pm$  SE) in Abhängigkeit des Gratings.

#### 4.1.6. Vergleich der Lymphgefäßdichte von Karzinomen unterschiedlicher Lokalisation

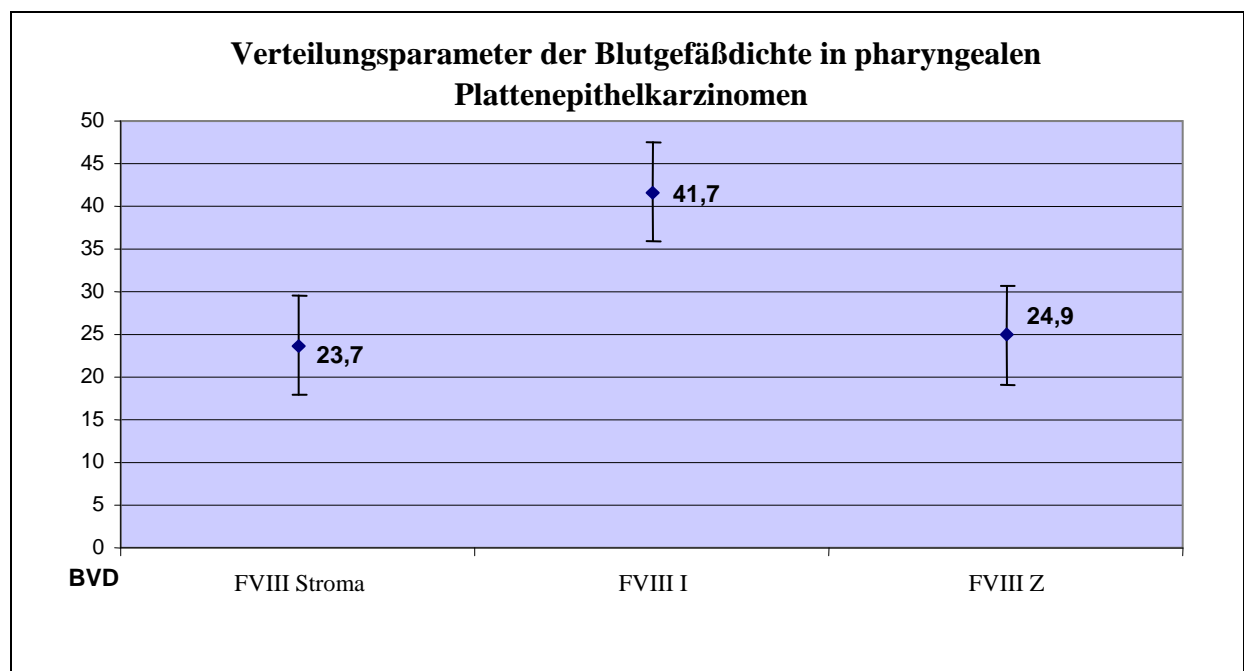
Von den 56 untersuchten pharyngealen Plattenepithelkarzinomen stammen 43 aus dem Oropharynx und 13 aus dem Hypopharynx. Der Vergleich der Lymphgefäßdichte unterschiedlicher Lokalisationen erfolgte in Abhängigkeit der pT-Kategorie für pT2 Karzinome. Im Hypopharynx stellte sich die Lymphgefäßdichte in Invasionszone und zentralen Anteilen geringfügig höher dar, als im Oropharynx. Dieser Unterschied konnte nicht als signifikant gesichert werden.

#### 4.1.7. Vergleich der Lymphgefäßdichte zur Lymphgefäßinvasion

Eine Aussage zum Status der Lymphgefäßinvasion war in 29 (51,8 %) von 56 Fällen möglich. Davon konnte in 11 Fällen eine Lymphgefäßinvasion nachgewiesen und in 18 Fällen ausgeschlossen werden. Die Lymphgefäßdichte der mit Lyve-1 und D2-40 markierten Gefäße in der Invasionszone und in den zentralen Anteilen zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Karzinomen mit und ohne Lymphgefäßinvasion (Ergebnisse im Einzelnen nicht dargestellt).

#### 4.2. Qualitative und quantitative Bewertung der Blutgefäßdichte mittels FVIII

Die mit FVIII markierten Endothelzellen stellten sich im histologischen Schnitt durch eine intensive Rotfärbung dar (Abb.15, 16). Es handelte sich vorwiegend um kleine Blutgefäßkapillaren, weshalb von Mikrogefäßdichte gesprochen wird. In der überwiegenden Anzahl wurden Erythrozyten im Lumen identifiziert. Im Gegensatz zu den Lymphgefäßen zeigten die Blutgefäße ein rundes, mit Erythrozyten gefülltes Lumen und sichtbar stärkere Wandschichtung. Auch intratumoral konnten Blutgefäßkapillaren mit offenem Lumen identifiziert werden (Abb.15, 16). Die Blutgefäßdichte der Invasionszone stellte sich um annähernd 30% höher dar als in den zentralen Anteilen (Abb.14). In allen untersuchten Karzinomen konnten zentrale Blutgefäße identifiziert werden. Mittelwert und Standardfehler der Blutgefäßdichte (BVD, blood vessel density) getrennt nach Invasionszone (I) und zentralen Anteilen (Z) sind Abbildung 14 zu entnehmen.



**Abb.14:** Verteilungsparameter (Mittelwert  $\pm$  SE) der Blutgefäßdichte mittels FVIII für nicht neoplastisch verändertes Stroma sowie für die Invasionszone und die zentralen Anteile der untersuchten Plattenepithelkarzinome.

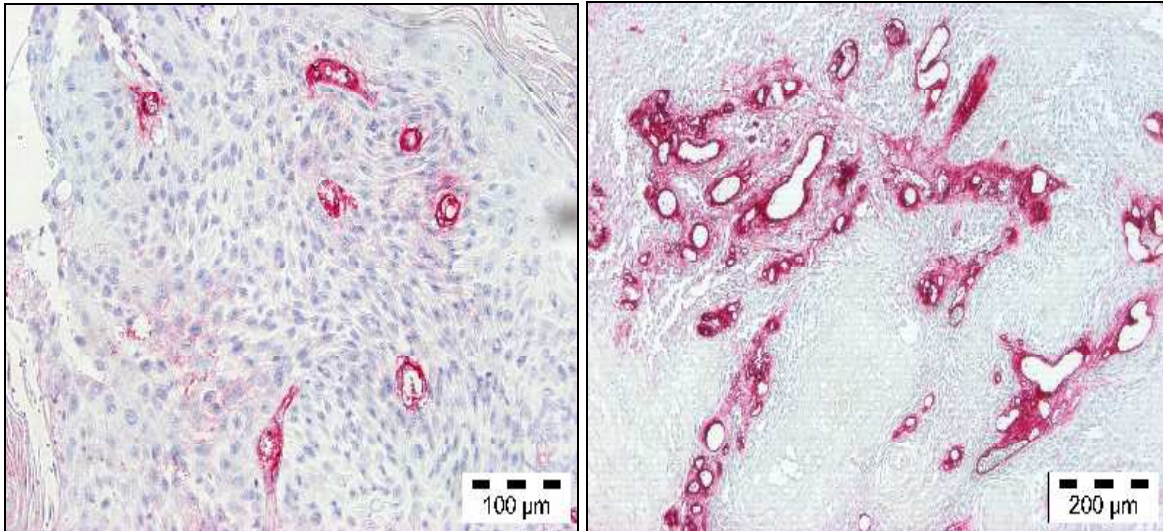


Abb.15

Abb.16

**Abb. 15 :** Zentrale Anteile eines pharyngealen Plattenepithelkarzinoms. Darstellung vereinzelter Blutgefäße mittels FVIII. Das Endothel ist durch die kontrastreiche Rotfärbung gut zu erkennen.

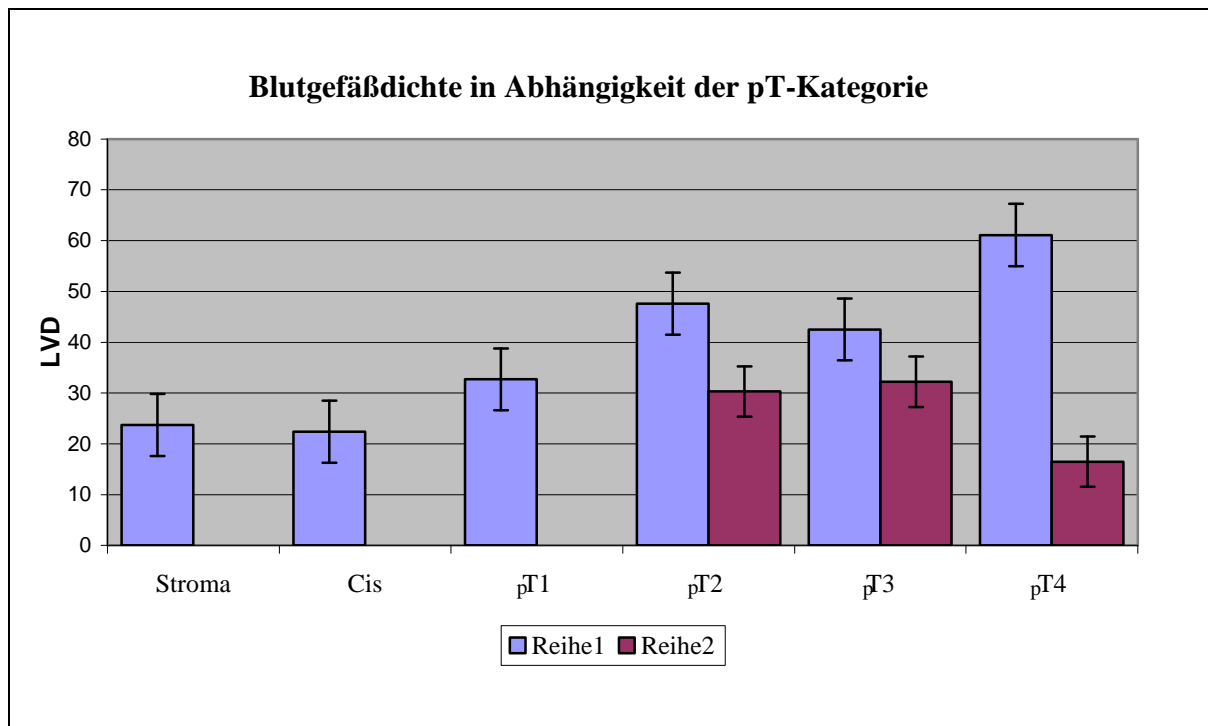
**Abb. 16 :** Pharyngeales Plattenepithelkarzinom mit erhöhter intratumoraler Blutgefäßdichte markiert mit FVIII.

#### **4.2.1. Vergleich der Blutgefäßdichte von nicht neoplastisch verändertem Stroma mit pharyngealen Plattenepithelkarzinomen**

Die mittlere Blutgefäßdichte in nicht neoplastisch verändertem Stroma betrug 24,8 und stellte sich nahezu gleich der zentralen Gefäßdichte der Karzinome dar. In der Invasionszone der Karzinome zeigten sich gegenüber dem Stroma annähernd zweifach erhöht. Der Vergleich mit den Karzinomen in Abhängigkeit der pT-Kategorie ist Abb. 16 zu entnehmen

#### **4.2.2. Vergleich der Blutgefäßdichte zur pT-Kategorie**

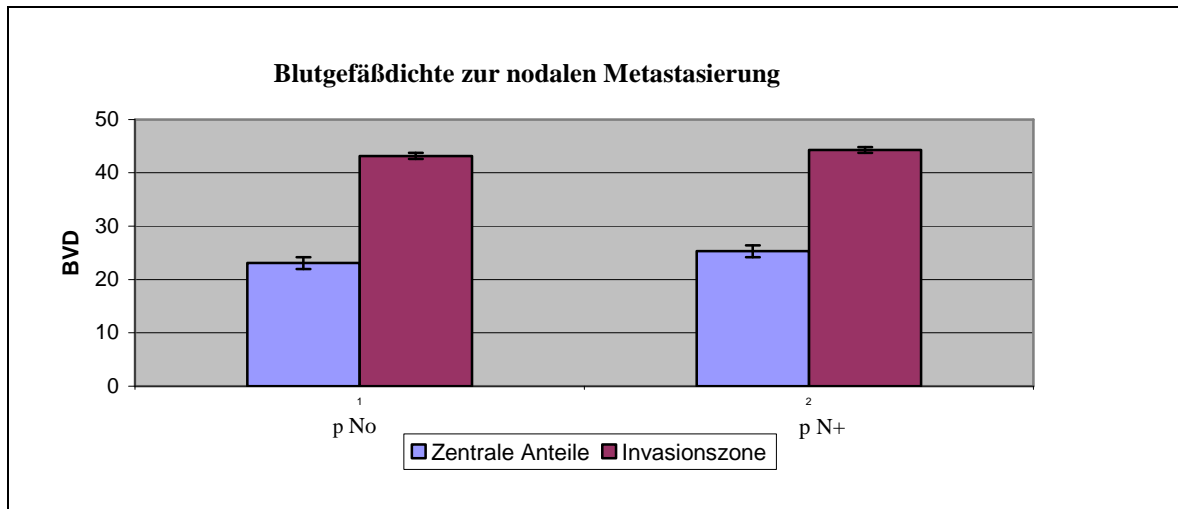
Die Blutgefäßdichte stellte sich in pT1/2 Karzinome geringfügig höher dar als in den Karzinomen der pT3/4 Kategorien. Im Vergleich der einzelnen pT-Kategorien zeigte die Invasionszone in den pT4 Karzinomen die höchste Blutgefäßdichte (Abb.16). Der Unterschied zwischen dem mikroinvasiven (pT1) und den invasiven Karzinomen (pT 2/3/4) konnte für die Blutgefäßdichte der Invasionszone als signifikant ( $p = 0,024$ ) gesichert werden. Dagegen konnte in den zentralen Anteilen ein Abfall von der pT2 und pT3 Kategorie zu Karzinomen der pT4 Kategorie beobachtet werden. Somit zeigten die pharyngealen Plattenepithelkarzinome mit zunehmender Tumorgroße eine signifikant erhöhte Blutgefäßdichte in der Invasionszone und eine verminderte Blutgefäßdichte in den zentralen Anteilen.



**Abb. 16:** Darstellung der Blutgefäßdichte (Mittelwert  $\pm$  SE) von nicht neoplastischem Stroma und pharyngealer Plattenepithelkarzinome in Abhängigkeit der pT-Kategorie (pT2-pT4: Reihe 1 steht für Invasionszone, Reihe 2 steht für zentralen Anteile)

#### 4.2.3. Vergleich der Blutgefäßdichte zur nodalen Metastasierung

Im Vergleich metastasierter zu nicht metastasierten Karzinomen konnten keine Unterschiede in Bezug auf die Blutgefäßdichte in der Invasionszone festgestellt werden. Dagegen zeigten die metastasierten Karzinome in den zentralen Anteilen eine minimal erhöhte Blutgefäßdichte (Abb.17). In der Auswertung der einzelnen pT-Kategorien zeigten metastasierte Karzinome der pT1 und pT2 Kategorie sowohl in der Invasionszone, als auch in den zentralen Anteilen gegenüber nicht metastasierten Karzinomen eine erhöhte Blutgefäßdichte. In der pT3 Kategorie fand sich eine erhöhte Blutgefäßdichte für nicht metastasierte Karzinome. Dagegen wiesen metastasierte Karzinome der pT4 Kategorie gegenüber nicht metastasierten Karzinomen zentral eine erhöhte und in der Invasionszone eine verminderte Blutgefäßdichte auf. Diese Unterschiede konnten nicht als signifikant gesichert werden. Insgesamt resultiert ein inhomogenes Verteilungsmuster der Blutgefäßdichte metastasierter und nicht metastasierter Karzinome.



**Abb. 17:** Darstellung der Blutgefäßdichte (Mittelwert  $\pm$  SE), gesondert für zentrale Anteile und Invasionszone im Vergleich von metastasierten (pN+) und nicht metastasierten Karzinomen (pNo).

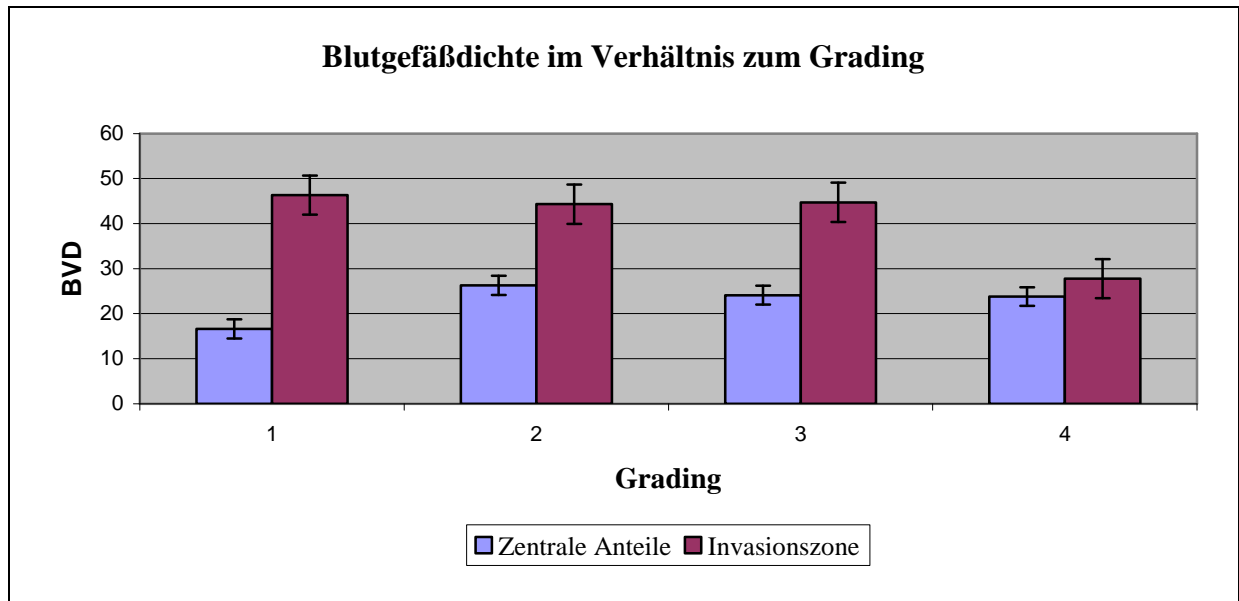
#### 4.2.4. Vergleich der Blutgefäßdichte zum Grading

Die Blutgefäßdichte stellte sich in den gut bis mäßig differenzierten Karzinomen G1/2 höher dar als in den schlecht und undifferenzierten Karzinomen G2/3 Abb. 18. Dabei zeigte sich ein kontinuierlicher Abfall der Blutgefäßdichte von gut differenzierten G1, über mäßig G2 bis schlecht G3, zu undifferenzierten bzw. anaplastischen Karzinomen des G4 Grades. Die Verringerung der Blutgefäßdichte in Karzinomen hohen histopathologischen Grades konnte in der Invasionszone und in den zentralen Anteilen beobachtet werden stellte sich aber in der Invasionszone deutlicher dar. Da  $p \geq 0,005$  konnte dieser Unterschied nicht als signifikant gesichert werden.

#### 4.2.5. Vergleich der Blutgefäßdichte von Karzinomen unterschiedlicher Lokalisation

Die Blutgefäßdichte stellte sich für die pT2 Kategorie in Karzinomen des Hypopharynx höher dar, als in Karzinomen des Oropharynx. Die gilt sowohl für die Invasionszone, als auch für die zentralen Anteile. Die Verteilung der Blutgefäßdichte in Abhängigkeit der Lokalisation stellt sich somit analog der Lymphgefäßdichte im Hypopharynx erhöht dar.





**Abb.18:** Darstellung der Blutgefäßdichte (Mittelwert  $\pm$  SE) in Abhängigkeit des histopathologischen Grades 1-4, gesondert für die zentralen Anteile und die Invasionszone der untersuchten Karzinome.

#### 4.3. Analyse der Zusammenhänge zwischen Lymph- und Blutgefäßdichte

Die Korrelationsanalyse zum Vergleich von Lymphgefäßdichte und Blutgefäßdichte der Invasionszone, zeigte keine Zusammenhänge zwischen den beiden Parametern (Pearson Korrelationskoeffizient ( $r = -0,004$  für Lyve-1;  $r = 0,116$  für D2-40)). Karzinome mit einer hohen Blutgefäßdichte in der Invasionszone wiesen nicht zugleich eine hohe Lymphgefäßdichte auf. Teilweise zeigten beide Parameter eine inverse Verteilung auf. Analog konnte in den zentralen Anteilen keine Korrelation zwischen der Blutgefäßdichte und der Lymphgefäßdichte festgestellt werden.

#### 4.4. Analyse der prognostischen Bedeutung von Lymph- und Blutgefäßdichte für die synchrone nodale Metastasierung

Es soll gezeigt werden welcher Parameter die höchste Aussagekraft für die Vorhersage der nodalen Metastasierung des pharyngealen Plattenepithelkarzinoms besitzt.

In die Auswertung wurden folgende klinisch-pathologische Einflussfaktoren aufgenommen: Ausdehnung des Primärtumors (pT) und histologischer Malignitätsgrad (G). Weiterhin wurden die Lymphgefäßdichte, jeweils für Lyve-1 und D2-40 sowie die

Blutgefäßdichte, getrennt für Invasionszone und zentrale Anteile, einbezogen. Die mittels Lyve-1 bestimmte Lymphgefäßdichte der Invasionszone, stellte sich gemeinsam mit dem Grading als der Faktor mit der größten Aussagekraft zur synchronen nodalen Metastasierung heraus. Die mittels Faktor VIII bestimmte Blutgefäßdichte und mittels D2-40 bestimmte Lymphgefäßdichte stellten sich als die Faktoren mit geringerem Einfluss auf die nodale Metastasierung dar.

Die Analyse zeigt, dass je höher die Lymphgefäßdichte in der Invasionszone der Karzinome ist, desto größer ist die Chance der nodalen Metastasierung. Im Einzelnen steigt die Chance der nodalen Metastasierung bei einer um drei Lymphgefäße erhöhten Lymphgefäßdichte um 42% (Odds Ratio). Über die Bestimmung der Lymphgefäßdichte mittels Lyve-1 sowie dem Grading, konnte mit einer Sensitivität von 76,5 % und einer Spezifität von 63,5% die nodale Metastasierung zugeordnet werden.

71% der untersuchten Karzinome konnten über die Bestimmung der Lymphgefäßdichte aus der Invasionszone, mittels Lyve-1 und dem Grading, als metastasiert oder nicht metastasiert richtig zugeordnet werden.

Wenn zusätzlich die pT-Kategorie einbezogen wird, lassen sich 78,6 % der Karzinome richtig einstufen. Daraus ist ersichtlich, dass die Lymphgefäßdichte der Invasionszone, neben den bekannten histopathologischen Parametern, ein gewichtiger Einflussfaktor hinsichtlich der Vorhersage einer stattgehabten nodalen Metastasierung ist.

### 5.1. Gefäßforschung in der Onkologie

Die Bedeutung der Blutgefäßneubildung für die Progression solider Tumore wurde in den letzten Jahrzehnten weitgehend untersucht. Das angiogeneseabhängige Wachstum war und ist Ziel zahlreicher Studien und hat bereits zu praxistauglichen Therapieansätzen geführt (Folkman 1972). Die Bestimmung der Mikrogefäßdichte, als immunhistologisches Korrelat der tumorinduzierten Angiogenese, stellt eine akzeptierte Methode zur Quantifizierung der Blutgefäßneubildung dar, wobei FVIII/vWF (von Willebrand Faktor) der am weitesten verbreitete Marker zur Darstellung der Blutgefäße ist (Weidner 1995b).

Da Karzinome mit hoher Frequenz zu den regionalen Lymphknoten metastasieren, ist das Lymphgefäßsystem die wichtigste Struktur der Tumorzellverbreitung. Insbesondere Kopf-Hals-Tumore die zu 90% aus Plattenepithelkarzinomen bestehen weisen eine sehr frühe und primär lymphogene Verbreitung auf (Barnes et al. 2005). Die hohe Mortalität ist hauptsächlich auf die nodale Metastasierung zurückzuführen, welche neben Tumorgröße und extrakapsulärem Wachstum den wichtigsten prognostischen Faktor darstellt. Die 5-Jahres-Überlebensrate pharyngealer Plattenepithelkarzinome liegt im Durchschnitt bei 62,5% und konnte in den letzten dreißig Jahren nicht wesentlich verbessert werden (Barnes et al. 2005). Im Zuge der Entdeckung spezifischer Lymphendothelzellmarker, welche eine selektive Darstellung der Lymphgefäße im histologischen Routinematerial ermöglichen, sind diese aus ihrem Schattendasein in den Mittelpunkt der aktuellen Gefäßforschung gerückt. In der vorliegenden Arbeit wurden Lymph- und Blutgefäßdichte am gleichen Tumormaterial standardisiert erfasst. Das Vorhandensein einer tumorinduzierten Lymphangiogenese und deren Bedeutung für die lymphogene Metastasierung sind nicht abschließend geklärt. Ob die Quantifizierung der Lymphgefäßdichte mit den neuen immunhistochemischen Endothelzellmarkern D2-40 und Lyve-1 eine reliable und praxistaugliche Methode darstellt und ob über die Bestimmung der Lymphgefäßdichte eine Aussage zur nodalen Metastasierung getroffen werden kann, soll mit Hilfe der gewonnenen Ergebnisse, im Kontext des aktuellen Wissensstandes, erörtert werden. In der Hoffnung, dass daraus resultierende Erkenntnisse über die Prozesse der Metastasierung, im allgemeinen und für das pharyngeale Plattenepithelkarzinom im Besonderen, neue diagnostische sowie therapeutische Perspektiven eröffnen.

## **5.2. Neue Lymphendothelzellmarker - reproduzierbare Darstellung der Lymphgefäße trotz Kreuzreaktivität**

Die neuen Endothelzellmarker Lyve-1 und D2-40 ermöglichen über die selektive Bindung von Oberflächenantigenen eine direkte Darstellung von Lymphgefäßen in formalinfixiertem paraffineingebettetem Gewebe. In der vorliegenden Arbeit gelang dies in allen 57 Karzinomen. Wobei die Marker ein ungleiches Bindungsmuster aufwiesen. In den zentralen Anteilen der Plattenepithelkarzinome kamen in den mit Lyve-1 gefärbten Präparaten weniger Lymphgefäße zur Darstellung. Im Vergleich zu D2-40 scheint Lyve-1 intratumoral nur eine Subpopulation von Lymphendothelzellen zu markieren (Renyi-Vamos et al. 2005). Ursächlich könnte die unterschiedlich starke Expression des Hyaluronrezeptors in verschiedenen Geweben, entsprechend deren funktionalen Anforderungen sein. So konnte gezeigt werden, dass in Lymphknoten, Milz und Thymus eine starke, allerdings in der Tonsilla palatina nur eine schwache Expression vorhanden ist (Garrafa et al. 2005). Peritumorale Lymphgefäße konnten mittels Lyve-1 eindeutig dargestellt werden.

D2-40 zeigt, im Gegensatz zu Lyve-1, ein weitreichendes Reaktionsspektrum. Neben Lymphendothelzellen wurden Stroma- und Tumorzellen markiert. Kaiserling zeigte, dass die Reaktionsbreite von D2-40 Fibroblasten, Myofibroblasten, Epithelzellen und Tumorzellen umfasst (Kaiserling 2004). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass D2-40 nicht nur das gleiche Reaktionsmuster wie Podoplanin aufweist, sondern neben dem onkofetalen Sialoglykoprotein M2A auch Podoplanin erkennt (Schacht et al. 2005, Garrafa et al. 2005). Dieses, ebenfalls als Lymphendothelzellmarker bekannte Membranprotein, zeigt eine ursächlich nicht aufgeklärte erhöhte Expression in Plattenepithelkarzinomen (Schacht et al. 2005). Das D2-40 zwei differente Oberflächenmoleküle erkennt, stellt eine denkbare Erklärung für das weitreichende Expressionsmuster dar. Obwohl Lyve-1, als auch D2-40 spezifische Marker der Lymphendothelzellen darstellen, sind Unterschiede in der Intensität der Anfärbung, neben der methodischen Variabilität, zugleich durch die Heterogenität der Lymphgefäße erklärbar. Es ist bekannt, dass Lymphendothelzellen abhängig von ihrer Organlokalisation und dem Lymphsegment, strukturelle und damit funktionelle Unterschiede aufweisen (Garrafa et al. 2005). Weiterhin besteht die Annahme, dass neu gebildete Lymphgefäße die durch D2-40 detektierten Oberflächenantigene früher exprimieren als für Lyve-1, womit die vermehrte Anfärbung durch D2-40 ebenfalls begründet werden könnte (Renyi-Vamos et al. 2005).

Überdies kann nicht ausgeschlossen werden, dass Oberflächenantigene, speziell der intratumoralen Lymphgefäße durch Karzinomzellen oder deren Sekretionsprodukte verändert oder vernichtet werden, wonach eine Antikörperbindung nicht mehr möglich ist. Dies ist eine denkbare Erklärung für die verminderte Markierung intratumoraler Lymphgefäße mittels Lyve-1. Bisher existiert kein Goldstandard für den direkten Nachweis von Lymphgefäßen im histologischen Routinematerial. Einige Autoren sehen in der immunhistochemischen Doppelmarkierung die Methode der Wahl (Evangelou et al. 2005).

Das Homeobox Gen Prox-1 stellt, als intrazellulärer Marker, eine zukunftssträchtige Alternative dar (Wigle und Oliver 1999). Es ist essentiell für die Entwicklung des Lymphgefäßsystems und das gerichtete Aussprossen der frühen Endothelzellen von den Kardinalvenen. In bisherigen Studien konnte mittels Prox-1 ein konsistentes Ergebnis in normalem und pathologisch verändertem Gewebe erzielt werden (Garaffa et al. 2005, Wigle et al. 2002).

Trotz der variablen Markierungen und der Kreuzreaktivität ermöglichten Lyve-1 und D2-40 den Nachweis von Lymphgefäßen und die sichere Differenzierung zu Blutgefäßen in pharyngealen Plattenepithelkarzinomen und nicht neoplastischem Stroma. Die Immunhistochemie mittels Lyve-1 und D2-40 stellt nach eigenen Erkenntnissen eine praxistaugliche Methode zur Bewertung der Lymphgefäßdichte und zur verbesserten Identifikation der Lymphgefäßinvasion dar. Weiterhin ist der Einsatz zur experimentellen Isolierung von Lymphendothelzellen und zur Objektivierung der Wirkung anti-lymphangiogener Substanzen möglich (Garaffa et al. 2005, Tozer 2003).

Neben der differenzierten Betrachtung der neuen Endothelzellmarker bedarf auch der Zählmodus einer kritischen Evaluierung. In der eigenen Arbeit wurde analog den Vorgaben für die Bewertung der Blutgefäßdichte nach Noel Weidner verfahren (Weidner 1995b).

Insbesondere die subjektive Auswahl der zu zählenden vaskulären hotspots sorgte bereits in der Bewertung der Blutgefäßdichte für Einwände (Offersen et al. 2003) und stellt, neben der unterschiedlichen Methodik, eine Ursache der Variabilität zwischen den Untersuchungsergebnissen dar (Van der Auwera et al. 2006).

In den wenigen vorliegenden Arbeiten zur Lymphgefäßdichte in Kopf-Hals-Tumoren wurden unterschiedliche Marker und Zählmethoden angewandt, wodurch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse stark eingeschränkt ist. Eine Vereinheitlichung des Zählmodus sollte analog der heute weitestgehend akzeptierten Messung der Mikrogefäßdichte, erfolgen.

Bis die Auswertung der Lymphgefäßdichte nicht standardisiert ist, werden widersprüchliche Ergebnisse fortbestehen.

### 5.3. Bedeutung der Blutgefäßdichte und Verhältnis zur Lymphgefäßdichte

Zahlreiche Beweise konnten für das angiogeneseabhängige Wachstum solider Tumoren erbracht werden. Eine hohe Mikrogefäßdichte ist mit der Progression der malignen Erkrankung und einer signifikant schlechteren Prognose für das Überleben assoziiert (Weidner 1995a). In Kopf-Hals-Tumoren gelang dieser Nachweis den Arbeitsgruppen um Mikami und Albo. Sie stellten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der peritumoralen Mikrogefäßdichte und einer verminderten Überlebenszeit fest und schlussfolgerten, dass die Mikrogefäßdichte eine starke Assoziation zum Metastasierungspotential aufweist (Mikami et al. 1996, Albo et al. 1994). Auch Gasparini und Mitarbeiter konnten diesen Zusammenhang belegen (Gasparini et al. 1993).

Die Arbeitsgruppe um Sion-Vardy wies einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Mikrogefäßdichte und der Invasionstiefe des Larynxkarzinoms nach (Sion-Vardy et al. 2001). Die Mehrzahl der Autoren konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Mikrogefäßdichte und der nodalen Metastasierung feststellen (Foote et al. 2005, Erovic et al. 2005, Zatterstrom et al. 1995, Dray et al. 1995, Carrau et al. 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Blut- und Lymphgefäßdichte simultan an einem homogenen Patientengut für das pharyngeale Plattenepithelkarzinom als eine Lokalisation der Kopf-Hals-Tumore, untersucht. Ziel war es zu zeigen, wie dieses sich hinsichtlich der Lymphgefäßdichte und dem angiogenen Phänotyp verhält und welcher der Faktoren die größte prognostische Aussagekraft hinsichtlich der synchronen nodalen Metastasierung besitzt. In der eigenen Untersuchung zeigt die Blutgefäßdichte der Karzinome gegenüber nicht neoplastisch verändertem Stroma erhöhte Werte. In der Invasionszone steigt die Blutgefäßdichte mit zunehmender Tumorgroße an. Dies steht in Einklang mit den pathophysiologischen Erkenntnissen von Judah Folkman, wonach die zunehmende Mikrogefäßdichte den Mehrbedarf der proliferierenden Tumorzellmasse widerspiegelt (Folkman 1990). Dagegen zeigte sich in den zentralen Anteilen ein Abfall der Blutgefäßdichte in großen Tumoren. Nach heutigen Erkenntnissen existieren intratumoral extreme Bedingungen, darunter ein hoher interstitieller Druck sowie eine zentral zunehmende Hypoxie und Nekrose, welche ebenfalls die Endothelzellen betrifft (Denekamp 1984).

Die eigenen Ergebnissen lassen vermuten, dass in Karzinomen mit einem Durchmesser über 4 cm, auf Grund der intratumoral abnehmenden Mikrogefäßdichte, zentral keine Angiogeneese mehr stattfindet. In der vorliegenden Arbeit konnte übereinstimmend mit

den genannten Studien kein Zusammenhang zwischen der Blutgefäßdichte und der nodalen Metastasierung festgestellt werden. Die Korrelationsanalyse ließ keine Zusammenhänge zwischen Blut- und Lymphgefäßdichte jedes einzelnen Karzinoms erkennen. Zum Teil konnten inverse Verhältnisse beobachtet werden. Es ist bekannt, dass Angiogenese und Lymphangiogenese durch eine Vielzahl verwandter Wachstumsfaktoren und Rezeptoren reguliert werden, von denen die Molekülfamilie der VEGF am bedeutsamsten ist (McColl et al. 2004). Überschneidungen, welche eine gegenseitige Stimulation von Angiogenese und Lymphangiogenese zulassen, sind bekannt. VEGF-A fördert neben der Blutgefäßneubildung auch die peritumorale Lymphangiogenese (Björndahl et al. 2005a, Hirakawa et al. 2005). Ob dieser Sachverhalt auf Karzinome der Kopf- Hals-Region übertragen werden kann bedarf weiterer Untersuchungen. Während Sauter und Mitarbeiter erhöhte Level von VEGF-A in Kopf-Hals-Tumoren nachwiesen, stellten Tae und Mitarbeiter eine verminderte Expression während der Tumorprogression fest (Sauter et al. 1999; Tae et al. 2000).

Das Ausmaß von Angiogenese und Lymphangiogenese hängt von der Menge sezernierter Wachstumsfaktoren und deren proteolytischer Spaltung ab (Skobe et al. 2001, Ferrara und Alitalo 1999). Nach den Ergebnissen der simultanen Untersuchung von Lymph- und Blutgefäßdichte scheinen Angiogenese und Lymphangiogenese unabhängig regulierte Prozesse zu sein, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfinden. Bisher bestand die Annahme, dass die Mikrogefäßdichte der Prognosefaktor ist, welcher das Verhalten hinsichtlich der synchronen nodalen Metastasierung widerspiegelt. Signifikante Zusammenhänge konnten unter anderem für das Urothelkarzinom, das Magenkarzinom und das Mammakarzinom erbracht werden (Jaeger et al. 1995, Zhao et al. 2006, Horak et al. 1992).

In der eigenen Arbeit konnte dieser Zusammenhang nicht bestätigt werden. Die logistische Regressionsanalyse wies die Lymphgefäßdichte der Blutgefäßdichte in ihrer prognostischen Wertigkeit als überlegen aus. Ursächlich ist der tumorbiologische Hintergrund anzusehen. Die Bildung nodaler Metastasen erfolgt über die Lymphgefäße. Die Blutgefäßdichte hingegen stellt die Grundlage der Tumorprogression im Sinne von Proliferation und Organmetastasierung dar, welche ebenfalls bedeutsame Prognosekriterien darstellen.

Basierend auf den erläuterten Erkenntnissen kann geschlussfolgert werden, dass die Bestimmung der Lymphgefäßdichte als Indikator der synchronen nodalen Metastasierung unabhängig von der Bestimmung der Blutgefäßdichte erfolgen sollte, da beide Prognosefaktoren unterschiedliche Ereignisse während der Tumorprogression widerspiegeln.

#### 5.4. Tumorinduzierte Lymphangiogenese oder vorbestehende Lymphgefäße

Endgültige Beweise für eine tumorinduzierte Lymphangiogenese stehen noch aus.

Es konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass nicht neoplastisch verändertes Stroma der Kopf-Hals-Region eine geringere Lymphgefäßdichte aufweist, als tumorassoziiertes Stroma nodal metastasierter Karzinome. Ob die peritumoral erhöhte Lymphgefäßdichte aus einer aktiven Lymphangiogenese hervorgegangen ist wird bislang noch diskutiert. Einige Autoren sehen die peritumoral erhöhte Gefäßdichte als eine Ansammlung preexistierender Lymphgefäße. Diese sollen durch die proliferierende Tumormasse in der Invasionsfront zusammengedrängt, vorbestehende Lymphgefäße des Stromas, sein (Leu et al. 2000).

Im Gegensatz dazu konnten jüngst experimentelle Beweise für eine aktive Lymphangiogenese erbracht werden. Die Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D sowie deren Rezeptor VEGFR-3 zeigen eine erhöhte Expression in Tumormodellen (Mandriota et al. 2001, Stacker et al. 2001, Karpanen et al. 2001). Dies konnte auch für Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region nachgewiesen werden (Neuchrist et al. 2003). Weiterhin zeigen Studien unter Verwendung des Proliferationsmarkers Ki67 das Vorhandensein aktivierter Lymphendothelzellen im Tumor (Renyi-Vamos et al. 2005).

Insgesamt existieren kontroverse Berichte über die Lymphangiogenese und deren Beitrag zur nodalen Metastasierung in unterschiedlichen Tumorentitäten. Einigen Autoren gelang der Nachweis der tumorassoziierten Lymphangiogenese nicht. Trotz allem wiesen die untersuchten Karzinome nodale Metastasen auf (Agarwal et al. 2005, Clarijs et al. 2001).

Die lymphogene Metastasierung kann über vorbestehende Lymphgefäße erfolgen. Jedoch konnte gezeigt werden, dass über die Neubildung von Lymphgefäßen das lymphatische Fenster vergrößert und die Wahrscheinlichkeit der Verbreitung von Tumorzellen über die Lymphgefäße enorm gesteigert wird (Karpanen et al. 2001). Für die hämatogene Metastasierung konnte analog gezeigt werden, dass die zunehmende Vaskularisation die Anzahl der in der Blutzirkulation befindlichen Tumorzellzahl erhöht (Liotta et al. 1974). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Lymphgefäße unter dem Einfluss von VEGF-C eine Lumenerweiterung erfahren, wodurch die Oberfläche zusätzlich erweitert wird (Jeltsch et al. 1997, Isaka et al. 2004). Auch in der eigenen Arbeit stellten sich die peritumoralen Lymphgefäße mit weit geöffneten Lumina dar.



Unklar ist, ob neu gebildete tumorassoziierte Lymphgefäße Alterationen oder Abnormitäten hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion aufweisen, welche das Eindringen von Tumorzellen erleichtert. Bisher bestand die Annahme, dass diese passiv mit dem Einstrom von interstitieller Flüssigkeit in die Lymphgefäße gespült werden (Hartveit 1990). Neueste Erkenntnisse lassen aktive Transportmechanismen erkennen, welche primär die Zusammensetzung der Lymphe regulieren.

Irjala und Mitarbeiter konnten experimentell zeigen, dass Zelllinien aus Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region über die Bindung des Mannoserezeptors (MR) und des CLEVER-1 (common lymphatic endothelial and vascular endothelial receptor) die Adhäsion an das Lymphendothel realisieren (Irjala et al. 2003). CCL21, ursprünglich für das Lymphozytenhoming verantwortlich, ermöglicht über den CCR7 Chemokinrezeptor die Bindung von Melanomzellen an das Lymphendothel (Takeuchi et al. 2004). Die Ausbildung solcher Invasionsmechanismen könnte die Ursache für die primär lymphogene Metastasierung von Karzinomen sein (Muller et al. 2006).

Daneben besteht die Annahme, dass neu gebildete Lymphgefäße morphologische Alterationen aufweisen, welche das Eindringen der Tumorzellen begünstigen (Farnsworth et al. 2005, Pepper und Skobe 2003). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bedeutung der Lymphgefäße in der Tumorbiologie bislang weit unterschätzt wurde.

### **5.5. Die Invasionszone als Ort der Lymphangiogenese**

Im Zusammenhang mit der Fragestellung ob eine tumorinduzierte Lymphangiogenese stattfindet besteht die Kontroverse über deren Lokalisation. Intratumorale Lymphgefäße konnten nur in wenigen Tumorentitäten, wie Kopf-Hals-Tumoren, dem Mammakarzinom und dem Malignen Melanom beobachtet werden (Maula et al. 2003, Skobe et al. 2001, Dadras et al. 2003). Das Endometrium- und das Lungenkarzinom wiesen keine intratumoralen Lymphgefäße auf (Koukourakis et al. 2005).

In der vorliegenden Studie konnten zentral gelegene Lymphgefäße in 82% der Karzinome dargestellt werden. Beweise, ob die Funktionalität zentraler Lymphgefäße erhalten ist und ob diese einen Beitrag zur Metastasierung leisten, stehen bis heute aus. Padera und Mitarbeiter sehen das Kollabieren durch den von der proliferierenden Tumorzellmasse erzeugten interstitiellen Druck als Ursache für die fehlende Durchlässigkeit (Padera et al. 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass funktionale Lymphgefäße vorwiegend an den Tumorrändern existieren. Zentrale Lyve-1 positive Strukturen stellen, laut Padera, einzelne Lymphendothelzellen und kollabierte oder durch Tumorzellen ausgefüllte Lymphgefäße dar (Padera et al. 2002, Franchi et al. 2004). Auch in der eigenen Untersuchung stellten sich die zentral gelegenen Lymphgefäße vermehrt als schmaler Endothelsaum mit kollabiertem Lumen dar. Im Weiteren ist zu bezweifeln, dass die intratumoral herrschende Hypoxie und Azidose eine Lymphangiogenese zulassen.

Die Hypothese, dass intratumorale Lymphgefäße vorwiegend eingenommen und peritumorale neu gebildet sind, unterstützen Renyi-Vamos und Mitarbeiter indem sie zeigen, dass nur peritumorale Lymphendothelzellen positiv für den Proliferationsmarker Ki67 sind (Renyi-Vamos et al. 2005). In der eigenen Arbeit befanden sich die lymphogenen hotspots ebenfalls vorwiegend in der Invasionszone. Diese wiesen sichtbare Lumina, meist mit Lymphozyten, auf. Die peritumorale Lymphgefäßdichte stellte sich gegenüber den zentralen Anteilen, etwa um das Dreifache erhöht dar.

Mehrere Autoren konnten die verstärkte Expression lymphangiogener Wachstumsfaktoren, wie VEGF-C und -D, in tumorassoziiertem Stroma nachweisen (b.Skobe et al. 2001, Karpanen et al. 2001). Gombos und Mitarbeiter zeigten, dass VEGF-C in der Invasionszone gegenüber dem Tumorzentrum signifikant erhöht ist (Gombos et al. 2005). In diesem Sinne spiegelt das Verteilungsmuster der hotspots die unterschiedlichen Konzentrationen der Wachstumsfaktoren sowie lokale Unterschiede des Tumormikromilieus wider.

Grundlage der Lymphangiogenese sind vorbestehende Lymphgefäße des angrenzenden Stromas von denen das Aussprossen der Endothelzellen realisiert wird. Dies konnte durch He und Mitarbeiter bestätigt werden (He et al. 2004). Die assoziierte Entzündungsreaktion der Invasionszone leistet durch die Sekretion verschiedener lymphogener Wachstumsfaktoren einen zusätzlichen Beitrag (Schoppmann et al. 2002).

Von den eigenen Ergebnissen und dem aktuellen Wissensstand ausgehend stellen die peritumoralen hotspots funktionale Lymphgefäße dar, welche durch eine tumorinduzierte Lymphangiogenese entstanden sind.

### **5.6. Die Lymphgefäßdichte als Indikator der nodalen Metastasierung**

Nach der intensiven Beschäftigung mit der Mikrogefäßdichte in verschiedenen Tumorentitäten, besteht jetzt die Notwendigkeit die Lymphgefäßdichte zu evaluieren. Da die Bildung nodaler Metastasen über die Lymphgefäße realisiert wird, besteht die Annahme, dass die Dichte der Lymphgefäße das Metastasierungspotential widerspiegelt. Es konnte für verschiedene Karzinome gezeigt werden, dass die Lymphgefäßdichte mit dem Lymphknotenstatus korreliert und als unabhängiger Einflussfaktor der nodalen Metastasierung bewertet werden kann. Darunter für das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom, das Magenkarzinom, das kolorektale Karzinom sowie für das Urothelkarzinom und das Maligne Melanom (Renyi-Vamos et al. 2005, Takanami 2006, Nakamura et al. 2006, Kaneko et al. 2007, Miyata et al. 2006, Dadras et al. 2003). Das Mammakarzinom zeigt widersprüchliche Ergebnisse (b.Skobe et al. 2001, Kato et al. 2005).

Die Lymphgefäßdichte als immunhistologisches Korrelat der tumorinduzierten Lymphangiogenese, scheint als Indikator der nodalen Metastasierung in vielen Karzinomen geeignet. Zusätzlich zeigen die Wachstumsfaktoren der Lymphangiogenese, gemessen an dem mRNA Level, in vielen Karzinomen, darunter Kopf-Hals-Tumoren, erhöhte Konzentrationen (Sedivy et al. 2003, Gombos et al. 2005, O-charoenrat et al. 2001).

Kontroverse Untersuchungsergebnisse zur Lymphangiogenese in soliden Tumoren, können neben der biologischen Variabilität auch aus der uneinheitlichen Methodik resultieren. Es gilt herauszufinden, in welchen Karzinomen eine, für die nodale Metastasierung relevante Lymphangiogenese stattfindet, um zukünftig von einem nützlichen Prognosefaktor in diesem Karzinom zu profitieren.

### **5.7. Die Lymphgefäßdichte im pharyngealen Plattenepithelkarzinom**

Einige Studien verdeutlichen bereits, dass die Lymphangiogenese eine wichtige Rolle für die Metastasierung solider Tumore innehat, aber die Bedeutung der Lymphgefäßdichte im Fall des pharyngealen Plattenepithelkarzinoms ist unklar. Meinem Wissen nach existieren wenige Untersuchungen zur Lymphgefäßdichte und Lymphangiogenese in Kopf-Hals-Tumoren, obwohl gerade diese Karzinome durch eine frühe nodale Metastasierung gekennzeichnet sind und daher als Untersuchungsmaterial nahe liegen. Bislang vorliegende Studien zeigen widersprüchliche Ergebnisse und erlauben keine generelle Aussage über die

Bedeutung der Lymphgefäßdichte im Hinblick auf die synchrone nodale Metastasierung.

Kyzas und Mitarbeiter zeigten, dass sich die peritumorale und die intratumorale Lymphgefäßdichte zur nodalen Metastasierung signifikant darstellt (Kyzas et al. 2005). Ihr Untersuchungsgut beinhaltet jedoch keine pharyngealen Karzinome. Die Arbeitsgruppe um Audet konnte, unter Verwendung des Chalkley point countings die Zusammenhänge nur für Larynxkarzinome aufzeigen (Audet et al. 2005). Im Gegensatz dazu wiesen Beasley und Mitarbeiter die Korrelation der Lymphgefäßdichte zur nodalen Metastasierung nur für Oropharynxkarzinome nach (Beasley et al. 2002). Auch sie bewerteten ausschließlich die intratumorale Lymphgefäßdichte. Einzig die Arbeitsgruppe um Franchi bewertete die Lymphgefäßdichte in der Invasionszone und wies diese in der multivarianten Analyse als den aussagekräftigsten Parameter hinsichtlich der nodalen Metastasierung aus (Franchi et al. 2004). In der eigenen Arbeit zeigten sich peritumorale und intratumorale Lymphgefäßdichte in Karzinomen mit nodaler Metastasierung gegenüber Karzinomen ohne nodale Metastasierung erhöht. Der Zusammenhang zwischen der Lymphgefäßdichte und der nodalen Metastasierung stellte sich für die Invasionszone als signifikant dar.

In der logistischen Regressionsanalyse stellte sich die mittels Lyve-1 bestimmte Lymphgefäßdichte der Invasionszone, gemeinsam mit dem Grading, als die Parameter mit der größten Aussagekraft hinsichtlich des Lymphknotenstatus heraus. Mit einer Sensitivität von 71% konnten die Karzinome mittels Lymphgefäßdichte und Grading als metastasiert eingestuft werden. Unter Zunahme der T-Kategorie, als bekannten Prognosefaktor konnte eine Trefferquote von 78,6% erreicht werden. Interessant erwies sich die Tatsache, dass Karzinome der pT1/2 Kategorie eine signifikant höhere Lymphgefäßdichte aufwiesen als Karzinome der pT3/4 Kategorie. Es kann geschlussfolgert werden, dass die Lymphangiogenese ein frühzeitig stattfindender Prozess während der Progression pharyngealer Plattenepithelkarzinome ist. Dies stellt eine denkbare Erklärung für die frühzeitige nodale Metastasierung kleiner Primärtumore dar. Im Weiteren konnte ein Unterschied zwischen der Lymphgefäßdichte gut bis mäßig differenzierter zu undifferenzierter Karzinomen festgestellt werden. Neuchrist und Mitarbeiter zeigten bereits, dass Zelllinien aus Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region VEGF-C und VEGFR-3 exprimieren (Neuchrist et al. 2003), ob die verstärkte Bildung lymphangiogener Wachstumsfaktoren mit der Abnahme des histopathologischen Grades einhergeht, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen. Auch die Lokalisation der Karzinome scheint Einfluss auf das Ausmaß der

Lymphangiogenese zu nehmen. Stimmbandkarzinome zeigen die geringste Lymphgefäßdichte im Vergleich zu anderen Kopf-Hals-Tumoren (Koskinen et al. 2005). Da die Lymphangiogenese ihren Ausgang von vorbestehenden Lymphgefäßen als Grundlage für das Aussprossen, nimmt könnte das Ursprungsgewebe für das Ausmaß der Lymphgefäßneubildung von grundlegender Bedeutung sein. Aus diesem Grund sollte das Augenmerk bei zukünftigen Studien auf ein, hinsichtlich der Lokalisation, homogenes Patientengut gerichtet sein.

In Bezug auf die Studien zur Lymphgefäßdichte von Kopf-Hals-Tumoren muss angenommen werden, dass die heterogenen Untersuchungsergebnisse, neben der biologischen Variabilität der Karzinome, durch Abweichungen in der Methodik zustande gekommen sind.

Die vorliegende Studie belegt das Vorhandensein einer erhöhten Lymphgefäßdichte im pharyngealen Plattenepithelkarzinom. Der Lymphknotenstatus ist das Schlüsselkriterium für die Prognose und das sich anschließende Therapieregime dieser Karzinome. Die Bewertung der peritumoralen Lymphgefäßdichte am primären Operationspräparat stellt, neben dem aktuellen Staging eine neue Methode zur Erweiterung der prognostischen Aussagekraft des histologischen Präparates dar. Ziel ist es, mit Hilfe der Lymphgefäßdichte als Indikator der nodalen Metastasierung Risikopatienten zu identifizieren, auch als Entscheidungshilfe zur differentiellen Neck Dissektion. Insbesondere das hier untersuchte pharyngeale Plattenepithelkarzinom zeigt eine frühe und überwiegend nodale Metastasierung (Barnes et al. 2005). Die Frage ob in diesem Tumortyp eine Lymphgefäßneubildung, welche die nodale Metastasierung unterstützt, stattfindet, kann nach den eigenen Ergebnissen bejaht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die peritumorale Lymphgefäßdichte ein aussagekräftiger Indikator und bedeutsamer Einflussfaktor der synchronen nodalen Metastasierung im pharyngealen Plattenepithelkarzinom ist.

### **5.8. Anti-Lymphangiogenese als Perspektive in der Therapie solider Tumore**

Lymphgefäße sind auch als mögliche Zielstruktur neuer Therapiekonzepte in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Da Karzinome mit hoher Frequenz zu den regionalen Lymphknoten metastasieren und der Lymphknotenstatus entscheidend für das Überleben ist, soll dieser Aspekt selektiv angegriffen werden. Aktuell existiert neben der chirurgischen Neck Dissektion kein adäquates Verfahren zur Behandlung nodaler Metastasen bei Kopf-Hals-Tumoren.

Die VEGFs sind die am weitesten erforschten Wachstumsfaktoren der Lymphangiogenese. Analog der anti-angiogenen Therapie, stellen sie die primären Angriffspunkte einer zukünftigen anti-lymphangiogenen Therapie dar. Denkbar sind lösliche Antikörper oder Rezeptoren, welche die Wachstumsfaktoren VEGF-C und -D und deren Rezeptor VEGFR-3 neutralisierenden. He und Mitarbeiter zeigten, dass die tumorassoziierte Lymphangiogenese experimentell mit einem löslichen VEGFR-3 Fusionsprotein inhibiert und die nodale Metastasierung unterdrückt werden konnte (He et al 2002). Tyrosinkinaseinhibitoren stellen eine weitere Methode zur Hemmung der Rezeptorfunktion dar (Stacker et al. 2006).

Die sich stetig erweiternde Anzahl neu entdeckter Wachstumsfaktoren der Lymphangiogenese bietet immer mehr Angriffspunkte, wirft aber zugleich die Frage auf, ob die Anti-Lymphangiogenese als Monotherapie eines Proteins wirksam sein kann. Es hat sich gezeigt, dass Wachstumsfaktoren der Angiogenese, wie VEGF-A, auch die Lymphangiogenese induzieren (a.Bjorndahl et al. 2005). Bjorndahl und Mitarbeiter wiesen außerdem nach, dass die Insulin-like growth factors 1 und 2 in vivo proliferativ auf Lymphendothelzellen wirken (b.Bjorndahl et al. 2005b). Cao und Mitarbeit zeigten, dass PDGF (platelet-derived growth factor) ein potenter Induktor der Lymphangiogenese ist (Cao et al. 2006).

Daneben stellen Transkriptionsfaktoren wie Prox-1, Oberflächenmoleküle wie Podoplanin, Lyve-1 und D2-40, aber auch Proteasen als Aktivatoren von VEGF-C und -D, wie Plasmin, weitere, von den Wachstumsfaktoren unabhängige, Wege dar.

Analog der Anti-Angiogenese, können die tumorassoziierten Lymphgefäße Angriffsziel der antivaskulären Therapie sein. LyP-1 ist ein Peptid das selektiv die Apoptose von Lymphendothelzellen im Tumor realisiert (Laakkonen et al. 2004).

Der Einsatz der Anti-Lymphangiogenese ist einerseits vor und nach chirurgischer Therapie zur Senkung der Inzidenz nodaler Metastasen denkbar, aber auch im Fall primär inoperable Befunde, um die Progression der Erkrankung zu stoppen (Stacker et al. 2006).

Zum aktuellen Zeitpunkt ist die Anti-Lymphangiogenese klinisch noch nicht wirksam. Dieses Ziel sollte schnellst möglich umgesetzt werden, um insbesondere in Karzinomen, welche eine hohe Lymphgefäßdichte aufweisen, eine Verminderung der nodalen Metastasierung zu bewirken.

## **6. Schlussfolgerung**

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die neuen Lymphendothelzellmarker Lyve-1 und D2-40 zur Darstellung von Lymphgefäßen in paraffineingebettetem formalinfixiertem Gewebe geeignet sind. Die Auswertungen der peritumoralen und der intratumoralen Lymphgefäßdichte von 56 pharyngealen Plattenepithelkarzinomen sowie einem exemplarischen Carcinoma in situ und nicht neoplastisch verändertem Stroma der Kopf-Hals-Region zeigten folgende Ergebnisse. Intratumorale Lymphgefäße konnten in der überwiegenden Zahl der Karzinome nachgewiesen werden, wobei die lymphogenen hotspots vorwiegend in der Invasionszone lokalisiert waren.

Die peritumorale Lymphgefäßdichte zeigte sich im Vergleich von nicht metastasierten zu nodal metastasierten Karzinomen als signifikant erhöht. Somit kann angenommen werden, dass die Wahrscheinlichkeit der nodalen Metastasierung mit Zunahme der Lymphgefäßdichte steigt. Die peritumorale Lymphgefäßdichte kann demnach als Indikator der synchronen nodalen Metastasierung angesehen werden. Die logistische Regressionsanalyse wies die mittels Lyve-1 bestimmte, peritumorale Lymphgefäßdichte, neben dem Grading, als bedeutsamsten Einflussfaktor hinsichtlich der nodalen Metastasierung aus.

In Abhängigkeit der T-Kategorie konnte eine signifikant erhöhte Lymphgefäßdichte von Karzinomen niedriger, gegenüber Karzinomen hoher pT-Kategorie verzeichnet werden. Dies führt zu der Annahme, dass die Lymphangiogenese ein frühzeitig stattfindender Prozess während der Progression pharyngealer Plattenepithelkarzinome ist. Im Zusammenhang mit dem Grading zeigte sich eine erhöhte Lymphgefäßdichte mit zunehmender Entdifferenzierung. Dies könnte auf eine verstärkte Sekretion lymphangiogener Wachstumsfaktoren zurückzuführen sein.

Der Vergleich von Blut- und Lymphgefäßdichte zeigte keine Korrelation zwischen den Parametern. Angiogenese und Lymphangiogenese scheinen, trotz verwandter Wachstumsfaktoren, unabhängig regulierte Prozesse zu sein. Die Blutgefäßdichte erwies sich hinsichtlich der Vorhersage der nodalen Metastasierung, von untergeordneter Bedeutung.

Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte peritumorale Lymphgefäßdichte mit der synchronen nodalen Metastasierung in diesem Karzinom korreliert. Daraus kann geschlossen werden, dass über die vermehrte Bildung tumorassoziierter Lymphgefäße und der daraus folgenden Erweiterung des lymphatischen Fensters ein erhöhtes Metastasierungspotential resultiert.

## **6. Literaturverzeichnis**

Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA. 1998. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(2): 548-53.

Achen MG, McColl BK, Stacker SA. 2005. Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis. *Cancer Cell*. 7(2):121-7.

Achen MG, Mann GB, Stacker SA. 2006. Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis. *Br J Cancer*. 94(10):1355-60.

Agarwal B, Saxena R, Morimiya A, Mehrotra S, Badve S. 2005. Lymphangiogenesis does not occur in breast cancer. *Am J Surg Pathol*. 29(11):1449-55.

Akishima Y, Ito K, Zhang L, Ishikawa Y, Orikasa H, Kiguchi H, Akasaka Y, Komiyama K, Ishii T. 2004. Immunohistochemical detection of human small lymphatic vessels under normal and pathological conditions using the LYVE-1 antibody. *Virchows Arch*. 444(2):153-7.

Albo D, Granick MS, Jhala N, Atkinson B, Solomon MP. 1994. The relationship of angiogenesis to biological activity in human squamous cell carcinomas of the head and neck. *Ann Plast Surg*. 32(6):588-94.

Algire GH, Chalkley HW, Legallais FY, Park HD. 1945. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst*. 6:73-85.

Audet N, Beasley NJ, MacMillan C, Jackson DG, Gullane PJ, Kamel-Reid S. 2005. Lymphatic vessel density, nodal metastases, and prognosis in patients with head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 131(12):1065-70.



Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, Williams RA, Hibbs ML, Grail D, Kubo H, Stacker SA, Achen MG. 2005. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol.* 25(6):2441-9.

Baluk P, Morikawa S, Haskell A, Mancuso M, McDonald DM. 2003. Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol.* 163(5):1801-15.

Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R, Jones M, Jackson DG. 1999. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol.* 22;144(4):789-801.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. 2005. WHO Classification of Tumours. Pathology and genetics of Head and Neck Tumours. IARC Press: 107-208

Beasley NJ, Prevo R, Banerji S, Leek RD, Moore J, van Trappen P, Cox G, Harris AL, Jackson DG. 2002. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res.* 1;62(5):1315-20.

Bicknell R. 2002. An update of new targets for cancer treatment: vessels and matrix. *Ann Oncol.* 13 Suppl 4:25-8.

a.Bjorndahl MA, Cao R, Burton JB, Brakenhielm E, Religa P, Galter D, Wu L, Cao Y. 2005. Vascular endothelial growth factor-a promotes peritumoral lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res.* 15;65(20):9261-8.

b.Bjorndahl M, Cao R, Nissen LJ, Clasper S, Johnson LA, Xue Y, Zhou Z, Jackson D, Hansen AJ, Cao Y. 2005. Insulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(43):15593-8.

Boenisch T, Farmilo AJ, Stead RH, Key M, Welcher R, Harvey R, Atwood KN. 2003. Immunohistochemische Färbemethoden. *DakoCytomation* 3Aufl.

Bouck N. 1990. Tumor angiogenesis: the role of oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer Cells*. 2(6):179-85.

Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, Schaffner G, Kerjaschki D. 1997. Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol*. 151(4):1141-52.

Brem S, Cotran R, Folkman J. 1972. Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. *J Natl Cancer Inst*. 48(2):347-56.

Broders A. 1920. Squamous cell epithelioma of the lip. *JAMA* 74: 656-664.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. 1992. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol*. 166(4):375-81.

Cao R, Bjorndahl MA, Religa P, Clasper S, Garvin S, Galter D, Meister B, Ikomi F, Tritsarlis K, Dissing S, Ohhashi T, Jackson DG, Cao Y. 2006. PDGF-BB induces intra-tumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *Cancer Cell*. 6(4):333-45.

Carmeliet P. 2005. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 69 Suppl 3:4-10.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 4;380(6573):435-9.

Carrau RL, Barnes EL, Snyderman CH, Petruzzelli G, Kachman K, Rueger R, D'Amico F, Johnson JT. 1995. Tumor angiogenesis as a predictor of tumor aggressiveness and metastatic potential in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Invasion Metastasis*. 15:197-202.

Clarijs R, Schalkwijk L, Ruiter DJ, de Waal RM. 2001. Lack of lymphangiogenesis despite coexpression of VEGF-C and its receptor Flt-4 in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42(7):1422-8.

Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, Brown LF, Muzikansky A, Jackson DG, Ellwanger U, Garbe C, Mihm MC, Detmar M. 2003. Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol.* 162(6):1951-60.

Denekamp J. 1984. Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. *Acta Radiol Oncol.* 23(4):217-25.

Dray TG, Hardin NJ, Sofferman RA. 1995. Angiogenesis as a prognostic marker in early head and neck cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 104(9 Pt 1):724-9.

Ehrmann RL, Knoth M. 1968. Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy. *J Natl Cancer Inst.* 41(6):1329-41.

Eriksson U, Alitalo K. 1999. Structure, expression and receptor-binding properties of novel vascular endothelial growth factors. *Curr Top Microbiol Immunol.* 237:41-57.

Erovic BM, Neuchrist C, Berger U, El-Rabadi K, Burian M. 2005. Quantitation of microvessel density in squamous cell carcinoma of the head and neck by computer-aided image analysis. *Wien Klin Wochenschr.* 117(1-2):53-7.

Evangelou E, Kyzas PA, Trikalinos TA. 2005. Comparison of the diagnostic accuracy of lymphatic endothelium markers: Bayesian approach. *Mod Pathol.* 18(11):1490-7.

Farnsworth RH, Achen MG, Stacker SA. 2005. Lymphatic endothelium: an important interactive surface for malignant cells. *Pulm Pharmacol Ther.* 19(1):51-60.

Ferrara N, Alitalo K. 1999. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med.* 5(12):1359-64.

Ferrara N, Henzel WJ. 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 15;161(2): 851-8.

Fidler IJ, Ellis LM. 1994. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell.* 21;79(2):185-8.

Fidler IJ. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 3(6):453-8.

Folkman J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 18;285(21):1182-6.

Folkman J. 1972. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg.* 175(3):409-16.

Folkman J. 1990. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 3;82(1):4-6

Folkman J, Hochberg M. 1973. Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med.* 1;138(4):745-53.

Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. 1971. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med.* 1;133(2):275-88.

Foote RL, Weidner N, Harris J, Hammond E, Lewis JE, Vuong T, Ang KK, Fu KK. 2005. Evaluation of tumor angiogenesis measured with microvessel density (MVD) as a prognostic indicator in nasopharyngeal carcinoma: results of RTOG 9505. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1;61(3):745-53.

Franchi A, Gallo O, Massi D, Baroni G, Santucci M. 2004. Tumor lymphangiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma: a morphometric study with clinical correlations. *Cancer*. 1;101(5):973-8.

Fukumura D, Xu L, Chen Y, Gohongi T, Seed B, Jain RK. 2001. Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Res*. 15;61(16):6020-4.

Garrafa E, Trainini L, Benetti A, Saba E, Fezzardi L, Lorusso B, Borghetti P, Bottio T, Ceri E, Portolani N, Bonardelli S, Giulini SM, Annibale G, Corradi A, Imberti L, Caruso A. 2005. Isolation, purification, and heterogeneity of human lymphatic endothelial cells from different tissues. *Lymphology*. 38(4):159-66.

Gasparini G, Weidner N, Maluta S, Pozza F, Boracchi P, Mezzetti M, Testolin A, Bevilacqua P. 1993. Intratumoral microvessel density and p53 protein: correlation with metastasis in head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*. 11;55(5):739-44.

Gerber HP, Ferrara N. 2005. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res*. 1;65(3):671-80.

Gimbrone MA Jr, Cotran RS, Leapman SB, Folkman J. 1974. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst*. 52(2):413-27.

Giorno R. 1984. A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagn Immunol*. 2(3):161-6.

Gombos Z, Xu X, Chu CS, Zhang PJ, Acs G. 2005. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res*. 1;11(23):8364-71.

Hart IR, Fidler IJ. 1980. Cancer invasion and metastasis. *Q Rev Biol.* 55(2):121-42.

Hartveit E. 1990. Attenuated cells in breast stroma: the missing lymphatic system of the breast. *Histopathology.* 16(6):533-43.

He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T, Alitalo K. 2002. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst.* 5;94(11):819-25.

He Y, Rajantie I, Ilmonen M, Makinen T, Karkkainen MJ, Haiko P, Salven P, Alitalo K. 2004. Preexisting lymphatic endothelium but not endothelial progenitor cells are essential for tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res.* 1;64(11):3737-40.

Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, Kajiya K, Brown LF, Detmar M. 2005. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med.* 4;201(7):1089-99.

Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. 2002. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst.* 19;94(12):883-93.

Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniowska K, Harris AL. 1992. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet.* 7;340(8828):1120-4.

Ide AG, Baker NH, Warren SL. 1939. Vascularization of the brown Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am. J. Roentgenol.* 42, 891–899

Irjala H, Alanen K, Grenman R, Heikkila P, Joensuu H, Jalkanen S. 2003. Mannose receptor (MR) and common lymphatic endothelial and vascular endothelial receptor (CLEVER)-1 direct the binding of cancer cells to the lymph vessel endothelium. *Cancer Res.* 1;63(15) :4671-6.

Isaka N, Padera TP, Hagendoorn J, Fukumura D, Jain RK. 2004. Peritumor lymphatics induced by vascular endothelial growth factor-C exhibit abnormal function. *Cancer Res.* 1;64(13):4400-4.

Jackson DG, Prevo R, Clasper S, Banerji S. 2001. LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis. *Trends Immunol.* 22(6):317-21.

Jaeger TM, Weidner N, Chew K, Moore DH, Kerschmann RL, Waldman FM, Carroll PR. 1995. Tumor angiogenesis correlates with lymph node metastases in invasive bladder cancer. *J Urol.* 154(1):69-71.

Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K. 1997. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science.* 30;276(5317):1423-5.

Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. 1996. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 15;15(2):290-98.

Jussila L, Valtola R, Partanen TA, Salven P, Heikkila P, Matikainen MT, Renkonen R, Kaipainen A, Detmar M, Tschachler E, Alitalo R, Alitalo K. 1998. Lymphatic endothelium and Kaposi's sarcoma spindle cells detected by antibodies against the vascular endothelial growth factor receptor-3. *Cancer Res.* 15;58(8):1599-604.

Kahn HJ, Bailey D, Marks A. 2002. Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas. *Mod Pathol.* 15(4):434-40

Kaneko I, Tanaka S, Oka S, Kawamura T, Hiyama T, Ito M, Yoshihara M, Shimamoto F, Chayama K. 2007. Lymphatic vessel density at the site of deepest penetration as a predictor of lymph node metastasis in submucosal colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 50(1):13-21.

- Kaiserling E. 2004. Immunhistochemische Darstellung von Lymphgefäßen mit D2-40 in der diagnostischen Pathologie. *Pathologe*. 25(5):362-74.
- Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Yla-Herttuala S, Jaattela M, Alitalo K. 2001. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res*. 1;61(5):1786-90.
- Kato T, Prevo R, Steers G, Roberts H, Leek RD, Kimura T, Kameoka S, Nishikawa T, Kobayashi M, Jackson DG, Harris AL, Gatter KC, Pezzella F. 2005. A quantitative analysis of lymphatic vessels in human breast cancer, based on LYVE-1 immunoreactivity. *Br J Cancer*. 14;93(10):1168-74.
- Koskinen WJ, Bono P, Leivo I, Vaheri A, Aaltonen LM, Joensuu H. 2005. Lymphatic vessel density in vocal cord carcinomas assessed with LYVE-1 receptor expression. *Radiother Oncol*. 77(2):172-5.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos C, Gatter KC, Harris AL, Jackson DG. 2005. LYVE-1 immunohistochemical assessment of lymphangiogenesis in endometrial and lung cancer. *J Clin Pathol*. 58(2):202-6.
- Kumar R, Yoneda J, Bucana CD, Fidler IJ. 1998. Regulation of distinct steps of angiogenesis by different angiogenic molecules. *Int J Oncol*. 12(4):749-57.
- Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A, Agnantis NJ, Stefanou D. 2005. Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol*. 206(2):170-7.
- Laakkonen P, Akerman ME, Biliran H, Yang M, Ferrer F, Karpanen T, Hoffman RM, Ruoslahti E. 2004. Antitumor activity of a homing peptide that targets tumor lymphatics and tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22;101(25):9381-6.



Leu AJ, Berk DA, Lymboussaki A, Alitalo K, Jain RK. 2000. Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res.* 15;60(16):4324-7.

Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. 1974. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res.* 34(5):997-1004.

Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC, Wise L, Mercer A, Kowalski H, Kerjaschki D, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K. 2001. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J.* 3;20(17):4762-73.

Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G, Pepper MS. 2001. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J.* 15;20(4):672-82.

Marks A, Sutherland DR, Bailey D, Iglesias J, Law J, Lei M, Yeger H, Banerjee D, Bauml R. 1999. Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours. *Br J Cancer.* 80(3-4):569-78.

Maula SM, Luukkaa M, Grenman R, Jackson D, Jalkanen S, Ristamaki R. 2003. Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Res.* 15;63(8):1920-6.

McColl BK, Baldwin ME, Roufail S, Freeman C, Moritz RL, Simpson RJ, Alitalo K, Stacker SA, Achen MG. 2003. Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *J Exp Med.* 15;198(6):863-8.

McColl BK, Stacker SA, Achen MG. 2004. Molecular regulation of the VEGF family -- inducers of angiogenesis and lymphangiogenesis. *APMIS*. 112(7-8):463-80.

McComb RD, Jones TR, Pizzo SV, Bigner DD. 1982. Specificity and sensitivity of immunohistochemical detection of factor VIII/von Willebrand factor antigen in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem*. 1982 Apr;30(4):371-7.

Mikami Y, Tsukuda M, Ito K, Arai Y, Ito T. 1996. Peritumoral angiogenesis in carcinomas of the head and neck. *Auris Nasus Larynx*. 23:57-62.

Miyata Y, Kanda S, Ohba K, Nomata K, Eguchi J, Hayashida Y, Kanetake H. 2006. Tumor lymphangiogenesis in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract: association with clinicopathological features and prognosis. *J Urol*. 176(1):348-53.

Müller AM, Franke FE, Muller KM. 2006. D2-40: a reliable marker in the diagnosis of pleural mesothelioma. *Pathobiology*. 73(1):50-4.

Muller A, Sonkoly E, Eulert C, Gerber PA, Kubitza R, Schirlau K, Franken-Kunkel P, Poremba C, Snyderman C, Klotz LO, Ruzicka T, Bier H, Zlotnik A, Whiteside TL, Homey B, Hoffmann TK. 2006. Chemokine receptors in head and neck cancer: association with metastatic spread and regulation during chemotherapy. *Int J Cancer*. 1;118(9):2147-57.

Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Imabun S, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Mori I, Kakudo K. 2005. Lymph vessel density correlates with nodal status, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 91(2):125-32.

Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Kurozumi K, Nakahara M, Nakao K, Kakudo K. 2006. Importance of lymph vessels in gastric cancer: a prognostic indicator in general and a predictor for lymph node metastasis in early stage cancer. *J Clin Pathol*. 59(1):77-82.

Nerlich AG, Schleicher E. 1991. Identification of lymph and blood capillaries by immunohistochemical staining for various basement membrane components. *Histochemistry*. 96(5):449-53.

Neuchrist C, Erovic BM, Handisurya A, Fischer MB, Steiner GE, Hollemann D, Gedlicka C, Saaristo A, Burian M. 2003. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Head Neck*. 25(6):464-74.

Nilsson F, Kosmehl H, Zardi L, Neri D. 2001. Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, mediates the infarction of solid tumors in mice. *Cancer Res*. 15;61(2):711-6.

Nowell PC. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1;194(4260):23-8.

O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA. 2001. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer*. 1;92(3):556-68.

Offersen BV, Borre M, Overgaard J. 2003. Quantification of angiogenesis as a prognostic marker in human carcinomas: a critical evaluation of histopathological methods for estimation of vascular density. *Eur J Cancer*. 39(7):881-90.

Ordonez NG. 2006. Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. *Adv Anat Pathol*. 13(2):83-8.

Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, Choi NC, Mathisen D, Wain J, Mark EJ, Munn LL, Jain RK. 2002. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science*. 7;296(5574):1883-6.

Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, Jain RK. 2004. Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature*. 19;427(6976):695.

Paget S. 1889. The distribution of secondary growth in cancer of the breast. *Lancet* 1: 571-73.

Partanen TA, Alitalo K, Miettinen M. 1999. Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. *Cancer*. 1;86(11): 2406-12.

Pepper MS, Skobe M. 2003. Lymphatic endothelium: morphological, molecular and functional properties. *J Cell Biol.* 27;163(2):209-13.

Prevo R, Banerji S, Ferguson DJ, Clasper S, Jackson DG. 2001. Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *J Biol Chem.* 1;276(22): 19420-30.

Renyi-Vamos F, Tovari J, Fillinger J, Timar J, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Agocs L, Soltesz I, Dome B. 2005. Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 15;11(20):7344-53.

Sauter ER, Nesbit M, Watson JC, Klein-Szanto A, Litwin S, Herlyn M. 1999. Vascular endothelial growth factor is a marker of tumor invasion and metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 5(4):775-82.

Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M. 2005. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol.* 166(3):913-21.

Schledzewski K, Falkowski M, Moldenhauer G, Metharom P, Kzhyshkowska J, Ganss R, Demory A, Falkowska-Hansen B, Kurzen H, Ugurel S, Geginat G, Arnold B, Goerd S. 2006. Lymphatic endothelium-specific hyaluronan receptor LYVE-1 is expressed by stabilin-1+, F4/80+, CD11b+ macrophages in malignant tumours and wound healing tissue in vivo and in bone marrow cultures in vitro: implications for the assessment of lymphangiogenesis. *J Pathol.* 209(1):67-77.

Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, Kriehuber E, Nagy K, Alitalo K, Kerjaschki D. 2002. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol.* 161(3):947-56.

Sedivy R, Beck-Mannagetta J, Haverkamp C, Battistutti W, Honigschnabl S. 2003. Expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with the lymphatic microvessel density and the nodal status in oral squamous cell cancer. *J Oral Pathol Med.* 32(8):455-60.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 25;219(4587):983-5.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* 6;376(6535):62-6.

Shibuya M. 2006. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 30;39(5):469-78.

Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 29;359(6398):843-5.

Sion-Vardy N, Fliss DM, Prinsloo I, Shoham-Vardi I, Benharroch D. 2001.

Neoangiogenesis in squamous cell carcinoma of the larynx - biological and prognostic associations. *Pathol Res Pract.* 197(1):1-5.

a.Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T, Schirner M, Wolf GL, Alitalo K, Detmar M. 2001. Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol.* 159(3):893-903.

b.Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M. 2001. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med.* 7(2):192-8.

Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K, Hughes LE. 1988. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study. *Am J Pathol.* 133(2):419-23.

Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG. 2001. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med.* 7(2):186-91.

Stacker SA, Hughes RA, Williams RA, Achen MG. 2006. Current strategies for modulating lymphangiogenesis signalling pathways in human disease. *Curr Med Chem.* 13(7):783-92.

Tae K, El-Naggar AK, Yoo E, Feng L, Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN, Shin DM. 2000. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in head and neck tumorigenesis. *Clin Cancer Res.* 6(7):2821-8.

Takanami I. 2006. Lymphatic microvessel density using D2-40 is associated with nodal metastasis in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 15(2):437-42.

Takeuchi H, Fujimoto A, Tanaka M, Yamano T, Hsueh E, Hoon DS. 2004. CCL21 chemokine regulates chemokine receptor CCR7 bearing malignant melanoma cells. Clin Cancer Res. 1;10(7):2351-8.

Tozer GM. Measuring tumour vascular response to antivascular and antiangiogenic drugs. 2003. Br J Radiol. 76 Spec No 1:S23-35.

Van der Auwera I, Van den Eynden GG, Colpaert CG, Van Laere SJ, van Dam P, Van Marck EA, Dirix LY, Vermeulen PB. 2005. Tumor lymphangiogenesis in inflammatory breast carcinoma: a histomorphometric study. Clin Cancer Res. 1;11(21):7637-42.

Van der Auwera I, Cao Y, Tille JC, Pepper MS, Jackson DG, Fox SB, Harris AL, Dirix LY, Vermeulen PB. 2006. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. Br J Cancer. 18;95(12):1611-25.

Weidner N. 1995a. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. Am J Pathol. 147(1):9-19.

Weidner N. 1995b. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. Breast Cancer Res Treat. 36(2): 169-80.

Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD, Jackson DG, Oliver G. 2002. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. EMBO J. 2;21(7):1505-13.

Wigle JT, Oliver G. 1999. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. Cell. 17;98(6):769-78.

Wittekind C, Meyer HJ, Bootz F. 2002. TNM, Klassifikation maligner Tumoren. Springer Berlin 6.: 19-33

Wrobel T, Dziegiel P, Mazur G, Zabel M, Kuliczowski K, Szuba A. 2005. LYVE-1 expression on high endothelial venules (HEVs) of lymph nodes. *Lymphology*. 38(3): 107-10.

Zatterstrom UK, Brun E, Willen R, Kjellen E, Wennerberg J. 1995. Tumor angiogenesis and prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*. 17(4):312-8.



## **Danksagung**

Die Durchführung der Arbeit, insbesondere der Immunhistochemie, wurde von der Europäischen Union gefördert. Project acronym: STROMA; Project title: Selective targeting of angiogenesis and of tumor stroma; Förderkennzeichen: 503233.

PD. Dr. med. habil. S. Koscielny bin ich dankbar, da er mir als Ansprechpartner mit wertvollen Hinweisen jederzeit behilflich war.

Prof. Dr. med. D. Eßer bin ich sehr dankbar für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung in allen organisatorischen Fragen sowie für sein ständig offenes Ohr.

Univ.-Prof. Dr. med. H. Kosmehl gilt mein ganz besonderer Dank für die großzügige Bereitstellung der Materialien und Geräte, sowie für die kreativen Diskussionen, die fachlichen Hinweise und seine Geduld.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Pathologie des HELIOS-Klinikums-Erfurt und insbesondere den MTAs Frau Fiedler und Frau Tunnat danke ich für die stets freundliche und hilfsbereite Unterstützung und Beratung.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. habil. S. Koscielny, Prof. Dr. med. D. Eßer, Univ.-Prof. Dr. med. H. Kosmehl, Dr. rer. nat. R. Vollandt, MTAs Frau Fiedler und Frau Tunnat,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem vorgelegten Inhalt der Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Erfurt, 09.05.2007

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name : Sarah Stötzel

Geburtsdatum : 26.11.1983

Geburtsort : Erfurt

Wohnort : Milanweg 4

99198 Kerspleben - Erfurt, Thüringen

Eltern : Thomas Stötzel, selbstständiger Bauunternehmer

Dagmar Stötzel geb. Krause, Zahntechnikerin

Staatsangehörigkeit : deutsch

Familienstand : ledig

### **Ausbildung**

09/1990 - 08/1994 Besuch der Grundschule Kerspleben

09/1994 - 06/2002 Besuch des Staatlichen Martin-Luther-Gymnasiums Erfurt

06/ 2002 Abitur (Note 1,1)

10/2002 - 09/2004 Studium der Medizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

09/2004 Physikum (Note 2,3)

10/2004 - 2007 Studium der Medizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Erfurt, 09.05.2007